

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Apoptóza v myokardu potkana: vliv morfinu

Apoptosis in rat myocardium: effect of morphine

Simona Moravcová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Novotný DSc.

Praha 2013

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně s použitím citované literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 6.5.2013

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému DSc. za vedení při metodickém zpracování, za cenné připomínky a odborné rady a za čas, který mi věnoval při sepisování diplomové práce. Dále děkuji celému kolektivu v laboratoři za vytvoření příjemné atmosféry a podnětného prostředí. Velké poděkování také patří celé mé rodině za podporu nejen při zpracovávání této práce, ale i během celého studia. Nakonec bych ráda poděkovala své sestře Radce Moravcové, která mi byla při vzniku této práce velikou oporou.

1. Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo studium exprese proteinů účastnících se apoptotického procesu v myokardu potkana v souvislosti s podáváním malých (0,1 mg/kg; 1 mg/kg) a velkých (10 mg/kg) dávek morfinu. Malé dávky byly podávány po dobu 28 dní, velké dávky po dobu 10 dní vždy jednou denně. V případě dávky 1 mg/kg byl navíc sledován také účinek 1 týdnu následné abstinence. Dalším z cílů bylo stanovení aktivity kaspázy-3 v kontrolních vzorcích myokardu potkana a ve vzorcích, které byly ovlivněny podáváním vysoké (10 mg/kg) dávky morfinu po dobu 10 dnů.

Rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí je klíčová při udržování homeostázy. Apoptotický proces je řízen proteiny z Bcl-2 rodiny. Tyto proteiny jsou schopny regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány, což může vést k uvolnění cytochromu c a jiných proteinů z mitochondrií. Uvolnění těchto proteinů poté vyvolává aktivaci výkonných enzymů apoptózy. V této práci jsme se zaměřili na sledování exprese proapoptotických proteinů AIF, Bax, Bak, Bid a antiapoptotického proteinu Bcl-2 ve vzorcích tkáně levých komor srdečních připravených z potkanů, jimž byly podávány různé dávky morfinu. U proteinu AIF bylo pozorováno významné snížení exprese po krátkodobém podání vysoké dávky morfinu. U ostatních proapoptotických proteinů nebyly nalezeny výrazné signifikantní změny v expresi působením morfinu. Exprese antiapoptotického Bcl-2 proteinu byla signifikantně zvýšena po dlouhodobém podání 0,1 mg/kg/den morfinu. Dalšími proteiny, které byly identifikovány ve vzorcích myokardu, byly kaspáza-3 a podjednotka její aktivní formy p11. V obou případech byly pozorovány signifikantní změny po podání 1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní s následnou týdenní abstinencí. Porovnáním exprese Akt 1/2/3 v kontrolních vzorcích se vzorky ovlivněnými morfinem nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. Byla zjištěna statisticky významná zvýšená exprese GSK-3 β ve vzorcích potkanů, kteří byli ovlivněni dlouhodobým (28 dní) podáváním nízké dávky (1 mg/kg/den) morfinu s následnou týdenní abstinencí.

Mezi nejvýznamnější efektorové kaspázy patří kaspáza-3. Ve vzorcích pravých a levých komor jedinců, kteří byli ovlivněni podáním vysoké dávky morfinu, byla změřena aktivita kaspázy-3 pomocí fluorescenčního substrátu N-Ac-DEVD-N'-MC-R110. U morfinem ovlivněných jedinců byla detekována poněkud snížená aktivita tohoto enzymu. Na základě těchto výsledků můžeme tedy usuzovat na protektivní působení této dávky morfinu.

Klíčová slova: apoptóza, kaspázy, morfin, myokard

2. Abstract

The aim of this dissertation was to study the expression of proteins that participate in apoptosis in myocardium of rats treated with low (0,1 mg/kg; 1 mg/kg) and high (10 mg/kg) doses of morphine. Low doses of morphine were administered daily for 28 days and high doses for 10 days. In addition, the effect of one week of drug withdrawal was studied in animals administered 1 mg/kg of morphine. Another aim was to determine activity of caspase-3 in samples of rat myocardium prepared from control rats and those exposed to high dose (10 mg/kg) of morphine for 10 days.

The balance between cell division and cell death is crucial for the maintenance of homeostasis. Apoptosis is controlled by proteins from the Bcl-2 family. These proteins are able to regulate permeability of outer mitochondrial membrane and may facilitate the release of cytochrom c and other proteins from mitochondria under certain conditions. The release of these proteins then leads to activation of executive enzymes of apoptosis. In this thesis we investigated the expression of proapoptotic proteins AIF, Bax, Bak, Bid and antiapoptotic protein Bcl-2 in samples from left myocardial ventricles of rats that was treated with different doses of morphine. Except for a significant decrease in the expression of AIF after short-term treatment with a high dose of morphine, there were no changes in the expression of the other proapoptotic proteins. The expression of antiapoptotic protein Bcl-2 was significantly increased after long-term morphine treatment using a dose of 0,1 mg/kg/day. Caspase-3 and its p11 subunit were other proteins that were identified in myocardial samples. In both cases significant differences were observed after treatment of morphine using a dose of 1 mg/kg/day for 28 days followed by one week of drug withdrawal. Whereas there was no significant difference in the expression of Akt 1/2/3, an increased expression of GSK-3 β was detected in samples from animals affected by long-term treatment with low dose of morphine (1 mg/kg/day for 28 days) followed by one week of drug withdrawal.

Caspase-3 belongs to the most important effector caspases. The activity of caspase-3 was measured using the fluorescent substrate N-Ac-DEVD-N'-MC-R110 in samples from the left and right ventricles of rats treated with high dose of morphine. Morphine exposure resulted in somewhat decreased activity of this enzyme. It can be concluded that, under these conditions, morphine may elicit cardioprotective effects.

Keywords: apoptosis, caspases, morphine, myocardium

3. Obsah

1. Abstrakt a klíčová slova.....	1
2. Abstract and keywords.....	2
3. Obsah.....	3
4. Seznam zkratk.....	5
5. Úvod.....	7
6. Literární přehled.....	8
6.1 Morfin.....	8
6.1.1 Působení morfinu v srdci.....	9
6.2 Mitochondrie a apoptóza.....	10
6.2.1 MPTP.....	11
6.2.1.1 VDAC.....	12
6.2.1.2 CyP-D.....	12
6.2.1.3 ANT.....	12
6.2.2 Cytochrom c.....	13
6.2.3 Vápník a jeho cyklus v buňce.....	13
6.3 Apoptóza.....	13
6.3.1 Apoptotické proteiny.....	15
6.3.1.1 Proapoptotické proteiny.....	16
6.3.1.2 Antiapoptotické proteiny.....	17
6.3.2 Kaspázy.....	17
6.3.2.1 Měření aktivity kaspáz.....	20
6.3.3 Apoptóza kardiomyocytů.....	21
7. Cíle diplomové práce.....	24
8. Materiál a metody.....	25
8.1 Laboratorní zvířata.....	25
8.2 Homogenizace a frakcionace myokardu.....	25
8.2.1 Roztoky.....	25
8.2.2 Pracovní postup.....	26
8.3 Stanovení proteinů.....	27
8.3.1 Roztoky.....	27
8.3.2 Pracovní postup.....	28
8.4 SDS-PAGE elektroforéza.....	28
8.4.1 Roztoky.....	28

8.4.2 Pracovní postup.....	29
8.5 Western blotting a imunodetekce.....	30
8.5.1 Roztoky.....	31
8.5.2 Pracovní postup.....	31
8.6 Analýza a vyhodnocení.....	32
8.7 Stanovení aktivity kaspázy-3.....	32
8.7.1 Laboratorní zvířata.....	33
8.7.2 Příprava vzorků a pracovní postup.....	33
8.7.3 Měření aktivity kaspázy-3.....	35
9. Výsledky.....	36
9.1 Studium exprese proapoptotických proteinů pomocí SDS-PAGE a metody Western blotting.....	36
9.2 Studium exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 pomocí SDS-PAGE a metody Western blotting.....	40
9.3 Studium exprese enzymů účastnících se apoptotického procesu v myokardu.....	41
9.4 Stanovení aktivity kaspázy-3 pomocí fluorescenčního substrátu ve vzorcích myokardu potkana.....	45
10. Diskuse.....	49
11. Závěr.....	54
12. Literatura.....	55

4. Seznam zkratek

AFC	7-amino-4-trifluoromethylcoumarin	7-amino-4-trifluorometylkumarín
AIF	apoptosis-inducing factor	apoptózu indukující faktor
AK	amino acid	aminokyselina
Akt 1/2/3	protein kinase B	protein kináza B
AMC	7-amino-4-methylcoumarin	7-amino-4-metylkumarín
ANT	adenine nucleotide translocase	adenin-nukleotid translokáza
Apaf1	apoptotic protease-activating factor	proteázu aktivující apoptotický faktor
Asp	aspartate	aspartát
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death	antagonista Bcl-2 proteinu způsobující buněčnou smrt
Bak	Bcl-2 antagonist killer 1	antagonista Bcl-2 proteinu způsobující buněčnou smrt
Bax	Bcl-2 associated X protein	s Bcl-2 související X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2	B-buněčný protein 2 z lymfomu
Bcl-x _L	Bcl-2 related protein, long isoform	Bcl-2 příbuzný protein, dlouhá izoforma
BH doména	BH domain	Bcl-2 homologní doména
Bid	BH3 interacting domain death agonist	agonista buněčné smrti s BH3 interagující doménou
CARD	caspase activation and recruitment domain	kaspázová aktivační a vazebná doména
CNS	central nervous system	centrální nervový systém
Cyp-D	cyclophilin-D	cyklofilin D
Cyt c	cytochrome c	cytochrom c
DED	death effector domain	efektorová doména smrti
DEV	tetrapeptide sequence aspartate- glutamate-valine-aspartate	tetrapeptid aspartát-glutamát-valin- aspartát
DISC	death-inducing signaling complex	signální komplex způsobující buněčnou smrt
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
endoG	endonuclease G	endonukleáza G

ERK	extracellular signal-regulated kinase	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FADD	Fas-associated death domain protein	s Fas asociovaný protein vlastní doménu smrti
Fas-R	Fatty acid synthetase receptor	receptor syntetázy mastných kyselin
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 β	glykogen syntáza kináza 3 β
GTPáza	GTPase	GTP fosfohydroláza
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	peroxid vodíku
ICE/CED-3	family of proteases	rodina proteáz
JNK	c-JUN N-terminal kinase	N-terminální kináza vázající fosforylovaný c-JUN
MPTP	mitochondrial permeability transition pore	mitochondriální pór způsobující přechodnou propustnost
N-Ac-DEVD-N'-MC-R110	N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110	N-DEVD-N'-morpholinkarbonyl-rodamin 110
OR	opioid receptor	opioidní receptor
O ₂ ⁻	oxygen anion	kyslíkový anion
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase	poly (ADP ribóza) polymeráza
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	fosfoinositol 3-kináza
PKC	protein kinase C	protein kináza C
pNA	p-nitroanilide	p-nitroanilid
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkové radikály
Ser	serine	serin
Smac	second mitochondrial activator of caspases	mitochondriální aktivátor kaspáz
TNF-R	tumor necrosis factor receptor	receptor vážící tumor necrosis factor
TRADD	TNFR-associated death domain protein	protein obsahující doménu smrti a interagující s TNF-R
VDAC	voltage-dependent anion channel	napětím ovládaný aniontový kanál
WHO	world health organisation	světová zdravotnická organizace
14-3-3	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	Tyrozín 3-monooxygenáza/tryptofan 5-monooxygenáza aktivující protein

5. Úvod

Opioidy jsou považovány za obávané látky především kvůli jejich nežádoucím účinkům, toleranci a závislosti, ale jejich protektivní a analgetické účinky se nedají opomenout. Morfin se používá pro tlumení poúrazových akutních i chronických bolestí, při léčbě infarktu myokardu, v menší míře také na tišení kašle či tlumení nezvladatelného průjmu.

Apoptóza je evolučně konzervovaný proces programované buněčné smrti, který hraje esenciální roli jak v embryonálním, tak v postnatálním vývoji. Účastní se udržování tkáňové homeostázy a rozhodujících a nezbytných procesů jako jsou regulace buněčného růstu, proliferace, diferenciace, ale také zánětlivých a imunitních procesů. Nedostatečná apoptóza může mít za následek nádorové bujení, zatímco nadměrná apoptóza může být součástí patogeneze mrtvice, infarktu myokardu či srdečního selhání. Mitochondrie obsahují mnoho molekul, které se účastní apoptotického procesu. Nepostradatelnou a podstatnou roli v apoptóze zprostředkovávají aspartátové proteázy, kaspázy. Detekce aktivních kaspáz v tkáni může být použita jako biochemický marker apoptózy.

Bylo provedeno mnoho experimentálních studií, které se zabývaly působením opioidů na CNS. V posledních letech ale vzrůstá počet experimentů zabývajících se opioidním systémem v srdci. Bylo zjištěno, že morfin vykazuje protektivní účinky v myokardu prostřednictvím aktivace δ -OR, ale také κ -OR, neboť tyto dva subtypy jsou převážně v myokardu exprimovány. Je známo, že morfin omezuje poškození tkáně, které vzniká při infarktu myokardu, a proto má studium protektivních účinků opioidů v léčbě kardiovaskulárních chorob významné místo.

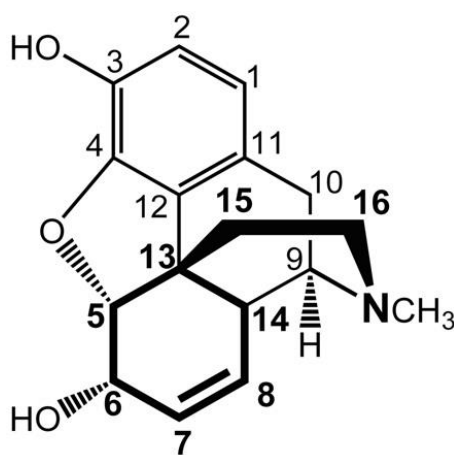
6. Literární přehled

6.1 Morfin

Morfin je přírodní opioid, který byl izolován na počátku 19. století Friedrichem Sertürnerem, německým lékárníkem, z máku setého (Duarte, 2005; Ballantyne, 2008). Latinsky se tato rostlina nazývá *Papaver somniferum* a řadí se mezi jedny z nejstarších léčivých rostlin. První zmínky o této rostlině s blahodárnými účinky pochází z Malé Asie, ale přesné konkrétní místo objevení není známo (Schiff, 2002).

Friedrich Sertürner (1783-1841) pojmenoval alkaloid vyizolovaný z máku setého podle řeckého boha snů, Morfea. Morfin (obr. 1) není pouze první alkaloid získaný z opia, ale je to také první alkaloid, který byl v dějinách lidstva izolovaný z rostliny.

Morfin se začal používat po objevení injekčních stříkaček a dutých jehel v polovině 19. století na drobné chirurgické zákroky, pooperační a chronickou bolest a jako doplněk k celkové anestezii. Ve skutečnosti to byl Claude Bernard, který poprvé podal morfin experimentálním zvířatům, když zjistil, že poté může použít pro navození anestezie menší množství chloroformu (Brownstein, 1993).



Obr. 1: Struktura morfinu (převzato z Boettcher et al., 2005). Morfin je nejvýznamnější alkaloid opia. Tento derivát fenantrenu se skládá z pěti kondenzovaných cyklů a obsahuje dvě funkční hydroxylové skupiny na uhlících C3 a C6 (Davis et al., 2009).

Morfin patří mezi nejúčinnější analgetika. Pomocí tohoto alkaloidu se léčí hlavně středně těžká až těžká bolest spojená s různými onemocněními. Podle WHO se v posledních dvou desetiletích výrazně zvýšila spotřeba morfinu ve světě, a to zejména v rozvinutých zemích.^[1] V roce 2003 se pouze 6 rozvinutých zemí podílelo ze 79 % na celkové spotřebě morfinu. Naopak rozvojové země, které představují 80 % světové populace, se podílely

na celkové spotřebě morfinu pouze z 6 %. Nejnovější údaje ukazují, že tento stav přetrvává. To znamená, že miliony pacientů se středně těžkou či těžkou bolestí, která je způsobena různými onemocněními, stále nejsou léčeni dostatečně účinným způsobem pro zmírnění jejich utrpení.

V nedávných studiích bylo prokázáno, že i savčí a lidské buněčné linie jsou schopny syntetizovat endogenní morfin (Poeaknapo et al., 2004; Boettcher et al., 2005). Biosyntéza morfinu u živočichů se velmi podobá syntéze, která probíhá v máku setém. Identifikace jednotlivých genů a enzymů odpovědných za biosyntézu morfinu u zvířat a lidí může poskytnout informace o evoluci této biosyntézy v živočišné říši. Význam a úloha endogenního morfinu u živočichů a člověka ale stále zůstává předmětem diskuse. Až se podaří tuto úlohu morfinu objasnit, stanou se geny a enzymy, které se účastní této biosyntézy, atraktivními cíli při tlumení bolesti, modulaci imunitní odpovědi a buněčné smrti (Boettcher et al., 2005).

6.1.1 Působení morfinu v srdci

Morfin se váže na všechny typy opioidních receptorů (OR) a nejvyšší afinitu vykazuje k μ -OR. Při výzkumech tkáňové distribuce OR u potkana bylo zjištěno, že se v srdci vyskytuje převážně mRNA pro δ -OR, v menší míře byla přítomna i mRNA κ -OR (Wittert et al., 1996). Pokusy, které byly prováděny na srdci, vedly ke zjištění, že μ -OR nejsou v této tkáni exprimovány (Pugsley, 2002; Wittert et al., 1996), a proto byly zkoumány převážně účinky opioidů na CNS. Přesto bylo provedeno několik studií, které se zabývaly zkoumáním přítomnosti μ -OR v srdci. V roce 2004 byla publikována práce, která dokládala, že kromě δ - a κ -OR, jsou také μ -OR zapojeny v kardioprotekci (Zhang et al., 2004). V tomto experimentu se ale předpokládalo, že tyto μ -OR nejsou umístěné v srdci, ale v CNS. Jejich aktivací dochází k inhibici sympatiku a k omezení výlevu noradrenalinu (Zhang et al., 2004). O rok později bylo zjištěno, že μ -OR jsou v určité míře přítomny v sarkolemální membráně srdečních myocytů (Head et al., 2005).

Signalizace prostřednictvím OR je významná nejen u buněčné proliferace, ale také souvisí s buněčnou smrtí. Ukázalo se, že růst podporující účinky nastávají při podání nízkých koncentrací opioidů a jsou pravděpodobně zprostředkovány díky aktivaci $G\beta\gamma$ podjednotky. Naopak růst potlačující účinky a apoptotická buněčná smrt nastávají při chronickém podávání opioidů v jejich relativně vysoké koncentraci (Tegeder and Geisslinger, 2004).

Opioidy zprostředkovaný preconditioning a postconditioning napodobují kardioprotektivní působení ischemického preconditioningu a postconditioningu. Je všeobecně známo, že morfin vykazuje kardioprotektivní účinky proti ischemicko-reperfúznímu

poškození a používá se pro zmírnění bolesti při akutním infarktu myokardu (Shi et al., 2003; Kim et al., 2010). Kardioprotektivní účinky morfinem-indukovaného preconditioningu jsou zprostředkovány δ -OR, což bylo zjištěno na konci 20. století (Schultz et al., 1997). Na počátku 21. století byl zkoumán opioidní postconditioning. Morfinem-indukovaný postconditioning vykazoval kardioprotektivní účinek na ischemicko-reperfúzní poškození a snižoval prostřednictvím δ -OR, respektive δ_1 -OR poškození způsobené infarktem myokardu (Kim et al., 2010; Jang et al., 2008).

V menší míře jsou v myokardu potkana zastoupeny také κ -OR. Bylo prokázáno, že i tento subtyp OR je zapojený v kardioprotekci. Aktivace κ -OR vedla k preconditioningu a ke snížení poškození srdce infarktem (Zhang et al., 2006). Intratekálně podaný morfin vyvolává podobné kardioprotektivní účinky jako jsou známé u ischemického preconditioningu a tato kardioprotekce je zprostředkována aktivací všech třech subtypů OR (Li et al., 2009). κ -OR je zapojen také v morfinem-indukovaném postconditioningu. Morfinem zprostředkovaný postconditioning vykazoval kardioprotektivní účinky prostřednictvím aktivace κ -OR a otevřením mitochondriálních ATP dependentních draslíkových kanálů (Chen et al., 2008b). Bylo tedy prokázáno zapojení obou nejčastěji se vyskytujících subtypů OR v morfinem indukovaném preconditioningu a postconditioningu.

6.2 Mitochondrie a apoptóza

Mitochondrie jsou kompartmentalizované buněčné struktury, které vznikly v evoluci eukaryotních buněk procesem nazývaným endosymbióza (Dyall et al., 2004). Tyto buněčné orgány jsou součástí několika buněčných signalizačních kaskád. Mezi vnější a vnitřní membránou mitochondrií se nachází intermembránový prostor, v němž je přítomno velké množství molekul, které se uvolňují po poškození vnější membrány do cytosolu. Mezi tyto molekuly patří hlavně cytochrom c, AIF nebo kaspázy 2 a 9, které se do cytosolu uvolňují během programované buněčné smrti (Susin et al., 1999a). Je zajímavé, že se některé GTPázy, kinázy a fosfatázy účastní komunikace mezi mitochondriálním retikulem a ostatními částmi buňky. Tyto proteiny propojují mitochondriální funkci a dynamiku s regulací metabolismu, buněčného cyklu, vývoje a buněčné smrti (McBride et al., 2006).

Spolu s mitochondriemi hrají významnou roli v apoptotickém procesu Bcl-2 proteiny. Tyto proteiny mohou regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány a při větší aktivitě proapoptotických proteinů dochází k uvolnění mitochondriálních molekul do cytosolu a k aktivaci apoptózy.

6.2.1 MPTP

V odpovědi buňky na stres může dojít ke zvýšení propustnosti mitochondriální membrány a k tvorbě napětově závislého nespecifického póru ve vnitřní membráně mitochondrií, který je známý jako MPTP (Javadov and Karmazyn, 2007). Mitochondriální pór způsobující přechodnou propustnost (MPTP) je komplex, který je pravděpodobně tvořen třemi součástmi. Jednou z nich je napětím ovládaný aniontový kanál (VDAC), který se nachází ve vnější membráně mitochondrií a je známý také jako porín. Druhou součástí je adenin-nukleotid translokáza (ANT), jenž je umístěna ve vnitřní mitochondriální membráně a poslední z částí je cyklofilin-D (CyP-D), který se nachází volně v matrix mitochondrií (Crompton, 1999). Dodnes se neustále spekuluje, zda jsou všechny tři součásti MPTP důležité pro jeho funkci (Patel et al., 2008). MPTP hraje významnou roli v modulaci buněčného a mitochondriálního objemu, mitochondriálního membránového potenciálu a vápníkové homeostáze.

Otevření MPTP vede ke zvýšené permeabilitě mitochondriální membrány. Skrz vnější mitochondriální membránu mohou tím pádem unikat malé molekuly do cytosolu a posilovat signální kaskádu vedoucí k apoptóze. Z toho důvodu je MPTP významným terapeutickým cílem pro kardioprotekci. Po podání morfinu bylo pozorováno, že prostřednictvím aktivace δ_1 -OR dochází k inhibici otevření MPTP (Kim et al., 2010). Studie vedená Obame a spolupracovníky ukázala, že morfin ochraňuje myokard před ischemicko-reperfučním poškozením prostřednictvím inhibice serin-treoninové protein kinázy GSK-3 β , jenž je známa modulací MPTP (Obame et al., 2008). Bylo navrženo, že působením morfinu dochází k inhibici GSK-3 β , tím pádem i k inhibici otevření MPTP. Morfin v tomto případě vykazoval kardioprotektivní účinky, ale přímý mechanismus regulace MPTP morfinem zůstává nejasný. Xi se svými kolegy vytvořili na základě předchozích pozorování (Jang et al, 2007; Chanoit et al., 2008) hypotézu, ve které předpokládají, že morfin může v kardiomyocytech vyvolat tvorbu NO, jenž prostřednictvím cGMP/PKG signalizační dráhy mobilizuje intracelulární Zn²⁺ a tyto zinečnaté ionty inhibují v srdečních buňkách GSK-3 β (Xi et al., 2010). GSK-3 β může být inhibována fosforylací na Ser-9. Tím dochází k inhibici MPTP a k navození kardioprotektivních účinků (Gomez et al., 2008).

Preconditioningem indukovaná kardioprotekce může nastat i po aktivaci κ -OR v srdci. Tato aktivace vedla k inhibici MPTP a ke snížení poškození srdce infarktem (Zhang et al., 2006).

6.2.1.1 VDAC

VDAC, známý také jako porín, je lokalizován ve vnější mitochondriální membráně. Jeho zapojení v apoptotickém procesu zůstává stále nejasné (Baines et al., 2007). Předpokládá se, že může interagovat s různými členy z rodiny Bcl-2 proteinů (Banerjee and Ghosh, 2004; Sugiyama et al., 2002), a tím může docházet například ke zvětšení velikosti tohoto póru (Banerjee and Ghosh, 2004).

6.2.1.2 CyP-D

CyP-D je mitochondriální izoforma z rodiny cyklofilinů. Tyto proteiny katalyzují *cis-trans* izomeraci peptidové vazby v proteinech. Přesná funkce cyklophilinů však ještě není objasněna. Jejich katalytická aktivita poukazuje na roli při vytváření správného konformačního stavu proteinů. Cyklofiliny také zrychlují „refolding“ denaturovaných proteinů (Crompton, 1999). CyP-D je blokován cyklosporinem A. Předpokládá se, že cyklosporin A blokuje MPTP tím, že zamezuje asociaci Cyp-D s ANT (Woodfield et al., 1998).

6.2.1.3 ANT

Předpokládá se, že ANT je jedna z nejdůležitějších součástí MPTP póru i přes to, že bylo zjištěno, že pro některé formy smrti je tato součást postradatelná (Kokoszka et al., 2004). Významnou roli hraje především v regulaci přechodné propustnosti tím, že moduluje citlivost MPTP k aktivaci pomocí Ca^{2+} a ANT ligandy (Kokoszka et al., 2004). Tato část má dva konformační stavy – m-konformační stav a c-konformační stav. Když je ANT obsazena nějakým substrátem (ADP, ATP), dochází ke střídání mezi těmito dvěma konformačními stavy. C-konformační stav je vyžadován pro otevření MPTP póru (Crompton, 1999).

U zdravých buněk funguje MPTP jako výměník nukleotidů. V odpovědi na stresový signál dojde ke konformační změně ANT a ta se přemění z ligand-specifické translokázy na nespecifický pór, který zapříčiní zhroucení membránového potenciálu. Zhroucením membránového potenciálu dojde ke vstupu vody do mitochondrií po osmotickém gradientu, ke zvětšení jejich objemu, k ruptuře vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c (Crow et al., 2004).

Mitochondrie hrají rozhodující roli v buněčném přežívání a v buněčné smrti. Hlavní funkcí ve zdravých srdečních myocytech je zajistit dostatek ATP a uspokojit energetické požadavky srdce (Halestrap et al., 2004). MPTP zůstává za normálních okolností uzavřený.

Přechodná propustnost mitochondriální membrány způsobí odprážení oxidace a fosforylace a v mitochondriích tedy nedochází k syntéze, ale k hydrolýze ATP. Přechodné otevření MPTP může vést k nekrotické smrti, ale také k programované buněčné smrti. Přechodná propustnost mitochondriální membrány vede k uvolnění cytochromu c a dalších proapoptotických molekul, které iniciují apoptotickou kaskádu.

6.2.2 Cytochrom c

Cytochrom c (cyt c) je především známý svojí úlohou v mitochondriích, kde se účastní elektron-transportního řetězce (Ow et al., 2008). Je to protein o molekulové hmotnosti 13 kDa vlastníci hemovou skupinu. Nemalou roli hraje také v apoptóze. Když dojde k poškození DNA či k nějakému jinému stresovému signálu, cytochrom c je uvolněn do cytosolu, kde tvoří spolu s Apaf1 a kaspázou-9 apoptozóm (Kluck et al., 1997; Ow et al., 2008).

6.2.3 Vápník a jeho cyklus v buňce

Kromě toho, že jsou mitochondrie nezastupitelné díky procesům oxidativní fosforylace a syntézy ATP, hrají především významnou roli v regulaci Ca^{2+} a tvorbě ROS (Javadov and Karmazyn, 2007). Aby bylo zaručeno přežití buňky, je energetický metabolismus a iontová homeostáza propojena dynamickým feedback mechanismem mezi mitochondriemi a cytosolem. Bylo zjištěno, že morfin vyvolává kardioprotektivní účinky prostřednictvím inhibice otevření MPTP a následně snížením uvolnění cytochromu c a vápníkovým přetížením (He et al., 2010).

Vápník je považován spolu s oxidativním stresem za jeden z nejzásadnějších aktivátorů MPTP póru (Halestrap et al., 2004). Srdeční myocyty nemohou pracovat bez Ca^{2+} iontů. V těchto buňkách dochází tedy ke koloběhu vápníku. K tomuto koloběhu vápníku dochází mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím i uvnitř buňky. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník transportuje přebytečný vápník výměnou za sodík ven z buňky. Vápník je také z cytosolu transportován pomocí Ca^{2+} ATPázy, která do sarkoplazmatického retikula čerpá přebytečný vápník za spotřeby energie.

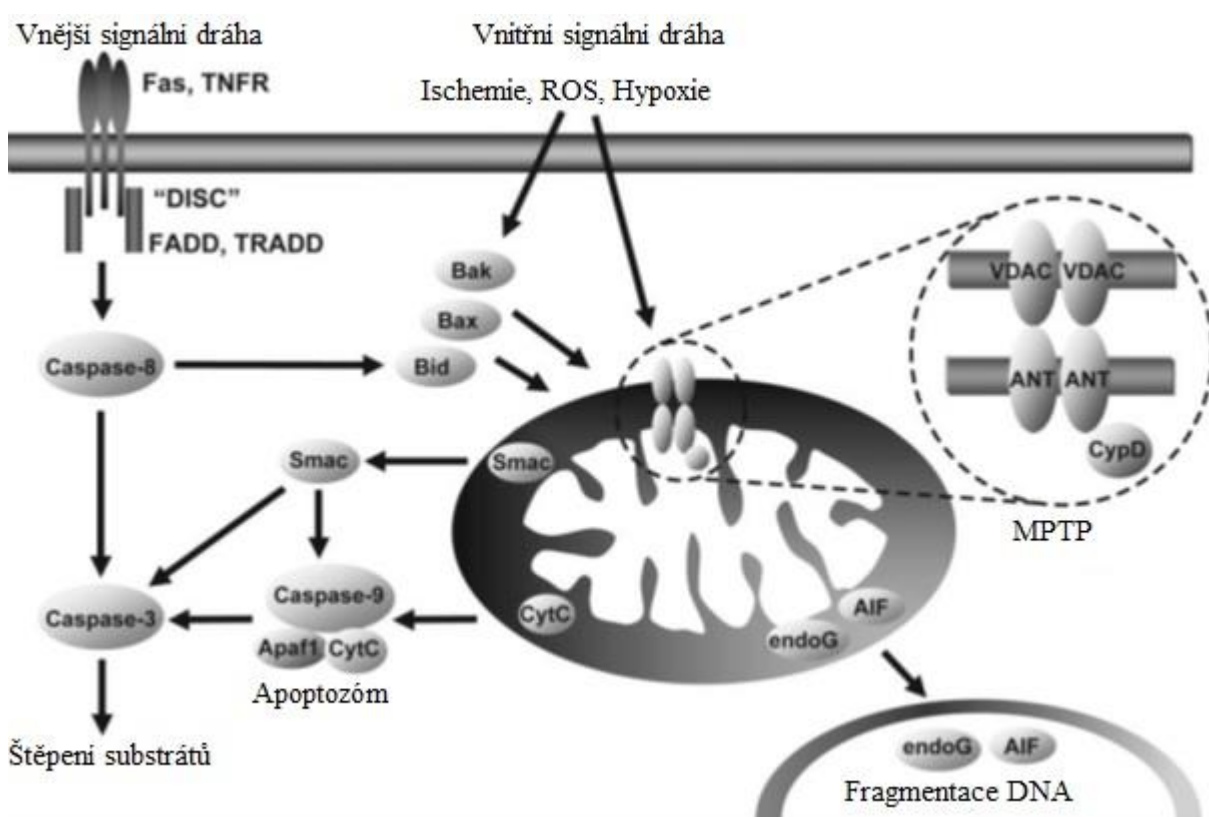
6.3 Apoptóza

Fascinující pozorování, že buněčná smrt je součástí normálního vývoje, bylo poprvé uskutečněno již před více než 150 lety, ale zájem o tuto oblast byl poměrně nevelký až do konce 20. století (Degterev et al., 2003).

Termín „apoptóza“ poprvé použil v roce 1972 ve své práci Kerr pro morfologicky odlišný způsob buněčné smrti (Kerr et al., 1972). Od té doby tato představa buněčné smrti

vzbudila velký zájem v cytologii a patologii. Byly nashromážděny přesvědčivé důkazy, že apoptotická buněčná smrt hraje významnou roli v různých kardiovaskulárních chorobách, zahrnujících infarkt myokardu, ischemii-reperfúzi, srdeční selhání a aterosklerózu (Haunstetter and Izumo, 1998).

U savců je apoptóza řízena dvěma molekulárními programy, které nakonec vedou k aktivaci kaspáz. Poté dochází ke štěpení substrátů těchto enzymů, což vede k zániku buňky (Danial, 2007). Tyto dva molekulární programy jsou známy jako vnější signální dráha a vnitřní signální dráha (obr. 2).

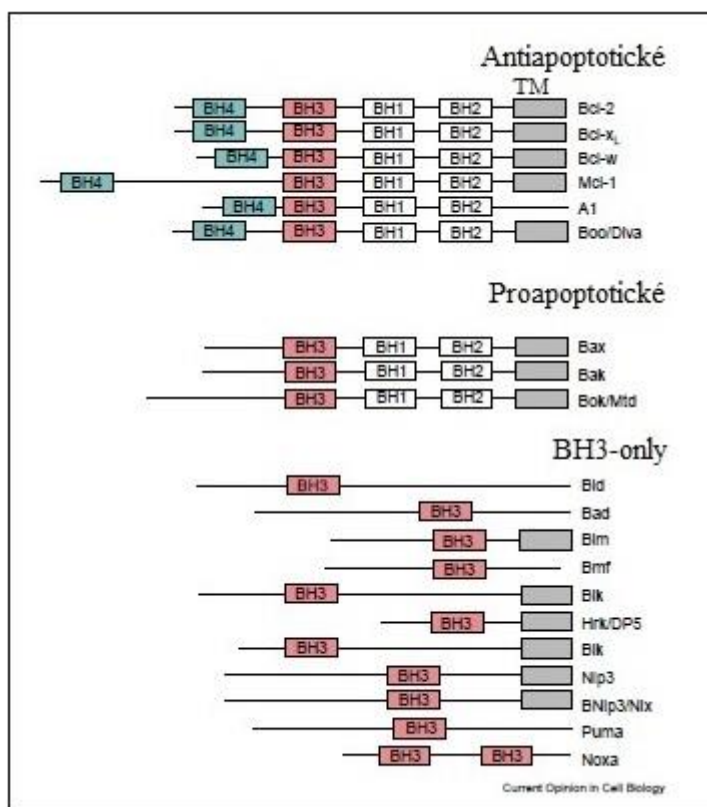


Obr. 2: Apoptotické signální dráhy v myokardu (upraveno podle Baines and Molkentin, 2005). Vnější apoptotická dráha je aktivována navázáním ligandu (FasL, TNF) na receptor smrti umístěný na buněčné membráně. Poté nastane navázání adaptorových proteinů (FADD, TRADD), což způsobí aktivaci iniciátorové kaspázy-8 a následně efektorové kaspázy-3. Ve vnitřní apoptotické dráze hrají klíčovou a zásadní roli mitochondrie. Ischemie, ROS či hypoxie jsou proapoptotické stimuly, které umožní přechodnou propustnost vnější a vnitřní mitochondriální membrány. Zásadní roli má MPTP, jehož součástí se nacházejí ve vnitřní i vnější membráně a v matrix mitochondrií. Po jeho otevření tak dochází k uvolnění apoptotických proteinů z mitochondrií do cytosolu (cyt c, Smac), a ty poté aktivují kaspázy, které štěpí své substráty. Z mitochondrií se uvolňují také endoG a AIF, které jsou translokovány do jádra, kde napomáhají k fragmentaci DNA.

Vnější signální dráha je zprostředkována „receptory smrti“, Fas-R a TNF-R. Vnitřní signální dráha je aktivována různými stresovými signály. Klíčovým průlomem byla identifikace cytochromu c – apoptogenního faktoru uvolňujícího se z mitochondrií, a tím se odhalila i důležitost mitochondrií ve vnitřní signální dráze (Li et al., 1997). Vnější a vnitřní signální dráha programované buněčné smrti se spolu propojují a ovlivňují navzájem (Igney and Krammer, 2002).

6.3.1 Apoptotické proteiny

Důležitá skupina proteinů regulujících apoptózu, jsou proteiny z rodiny Bcl-2. Tyto proteiny se dělí do dvou základních skupin podle toho, zda podporují nebo inhibují programovanou buněčnou smrt (Kuwana and Newmeyer, 2003).



Obr 3.: Rozdělení Bcl-2 proteinů (upraveno podle Kuwana and Newmeyer, 2003). Základní dělení proteinů podle počtu BH domén a podle toho, zda apoptózu inhibují či zprostředkovávají. Antiapoptotické Bcl-2 proteiny obsahují 4 BH domény, zatímco proapoptotické Bcl-2 proteiny jsou složeny pouze ze 3 BH domén. Do skupiny proapoptotických proteinů ještě řadíme BH3-only proteiny, které ve své struktuře obsahují pouze jednu, a to BH3 homologní doménu. TM = transmembránová oblast, BH1-BH4 = Bcl-2 homologní domény

Klasifikace členů z rodiny Bcl-2 proteinů závisí na počtu BH domén, které jednotlivé proteiny obsahují. Na základě tohoto kritéria se Bcl-2 proteiny dělí do třech základních skupin (obr. 3).

Většina (ale ne všechny) proteiny z Bcl-2 rodiny sídlí ve vnější membráně mitochondrií, kde jsou ukotvené prostřednictvím hydrofobní sekvence AK, která se nachází v blízkosti jejich COOH-konce. Protein je orientován směrem do cytosolu (Krajewski et al., 1993).

U některých apoptotických proteinů byla zjištěna 3D struktura. Ukázalo se, že proapoptotické proteiny mají velmi podobnou strukturu s proteiny antiapoptotickými. Jejich struktura se skládá ze dvou centrálních, převážně hydrofobních, α -helixů obklopených dalšími 6-7 amfipatickými α -helixy různé délky (Petros et al., 2004).

6.3.1.1 Proapoptotické proteiny

Zvýšená exprese proapoptotických členů z rodiny Bcl-2 poukazuje na to, že byl ve tkáni spuštěn proces programované buněčné smrti. V dnešní době je známo mnoho proapoptotických členů z rodiny Bcl-2 proteinů. V této kapitole jsou popsány pouze vybrané proteiny z této rodiny.

Multidoménové proapoptotické proteiny:

Bax

Proapoptotický protein Bax je jeden z nejlépe prozkoumaných členů z rodiny Bcl-2 proteinů. Proapoptotický protein Bax může způsobit indukci apoptózy a poškození mitochondrií, aniž by došlo k aktivaci kaspáz (Xiang et al., 1996). Bax je za normálních podmínek cytosolický protein, který po indukci apoptózy translokuje do membrány mitochondrií, kde se zakotví pomocí své domény na COOH-konci, tím může poskytnout uvolnění cytochromu c či jiných apoptogenních faktorů do cytosolu a šířit apoptotický signál dál (Wolter et al., 1997).

Bak

Tento člen z rodiny Bcl-2 proteinů je oproti proteinu Bax ukotven v mitochondriální membráně. Heteromerizace mezi jednotlivými členy z rodiny Bcl-2 je klíčovou událostí v regulaci programované buněčné smrti. Bylo zjištěno, že proapoptotický protein Bak vytváří heterodimery s antiapoptotickým proteinem Bcl-x_L prostřednictvím amfipatického α -helixu. Tato heteromerizace je zprostředkována hydrofobními a elektrostatickými interakcemi (Sattler et al., 1997).

BH3-only proapoptotické proteiny:

Bid

Protein Bid se za normálních podmínek nachází volně v cytosolu v neaktivní formě. Tento proapoptotický protein obsahuje pouze jednu homologní doménu, a to BH3. Po aktivaci, ke které dochází prostřednictvím proteolytického štěpení kaspázou-8, vznikne tBid, který translokuje do mitochondrií a slouží jako spojka mezi apoptotickou dráhou aktivovanou Fas a mitochondriální dráhou (Petros et al., 2004; Luo et al., 1998). Byly nalezeny tři izoformy proteinu Bid, které se liší lokalizací, ale také účinky na apoptotickou buněčnou smrt (Renshaw et al., 2004).

Bad

Tento protein se také řadí mezi BH3-only proteiny. Stejně jako protein Bak, vytváří proapoptotický protein Bad dimery s antiapoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-x_L. Bad vazbou na tyto antiapoptotické členy brání jejich antiapoptotické funkci a tím zprostředkovává buněčnou smrt (Kelekar et al., 1997).

6.3.1.2 Antiapoptotické proteiny

Nejlépe prozkoumanými antiapoptotickými proteiny z rodiny Bcl-2 proteinů jsou Bcl-2 a Bcl-x_L.

Bcl-2

Antiapoptotický protein Bcl-2 je tvořen osmi α -helixy s povrchovým hydrofobním žlábkem, do kterého se mohou vázat proapoptotické proteiny svými BH3 doménami a tím tento protein ztrácí své antiapoptotické účinky (Petros et al., 2004).

Bcl-x_L

Z celé rodiny Bcl-2 proteinů byla struktura tohoto proteinu publikována jako první. Bcl-x_L obsahuje ve své struktuře osm α -helixů, které jsou spojeny smyčkami různé délky. Ve své struktuře obsahuje také hydrofobní žlábek, do kterého se váží proapoptotické proteiny Bad či Bak (Petros et al., 2004).

6.3.2 Kaspázy

Kaspázy patří do rodiny cysteinových proteáz a hrají důležitou roli v regulaci apoptózy (Degterev et al., 2003; Kang and Izumo, 2003). Kaspázy jsou v buňce přítomné jako inaktivní zymogeny, které jsou aktivované během apoptózy (Nicholson, 1999). U některých

kaspáz dochází k autoaktivaci, která poté vede k aktivaci efektorových kaspáz. Tato proteolytická kaskáda, ve které mohou kaspázy aktivovat jiné, posiluje apoptotickou signalizaci a vede k rychlejší smrti buňky (Rastogi et al., 2009). Ne všichni členové z rodiny kaspáz se účastní apoptózy. Například kaspáza-1 a kaspáza-11 jsou především zahrnuté v procesech spojených se zánětlivými cytokiny, a to interleukinem 1 a 18 (Danial, 2007).

Dnes je známo 14 savčích kaspáz, z toho 11 proteáz je lidských (Nicholson, 1999). Kaspázy mohou být rozděleny podle různých kritérií – z hlediska příbuznosti s rodinou ICE nebo CED-3 (Alnemri et al., 1996), další dělení může být v závislosti na tom, zda proteáza obsahuje dlouhou, nebo krátkou prodoménu, eventuálně mohou být proteázy rozlišeny na základě jejich substrátové specifity (Thornberry et al., 1997; Rano et al., 1997). Na základě této kombinační metody za použití AMC substrátů byly zjištěny preferované tetrapeptidové substráty u všech 11 lidských kaspáz (Thornberry et al., 1997).

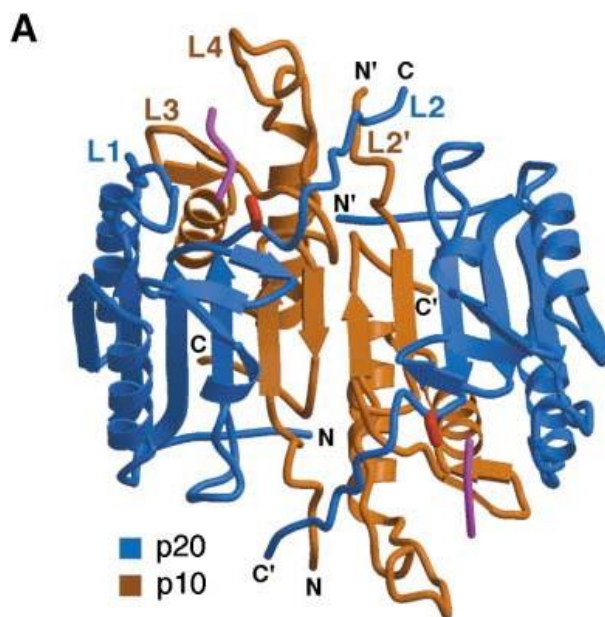
V závislosti na způsobu aktivace jsou kaspázy rozděleny do dvou kategorií, na iniciátorové a efektorové kaspázy (Shi, 2002). Rozdělení kaspáz shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled kaspáz (podle Rastogi et al., 2009)

Typ	Název	Synonymum
Iniciátorové	Kaspáza-2	ICH1, Nedd2
	Kaspáza-8	FLICE, MACH1, MCH5, FADD-like Ice
	Kaspáza-9	MCH6, ICELAP6
	Kaspáza-10	FLICE2, MCH4
Efektorové	Kaspáza-3	CPP32, YAMA
	Kaspáza-6	MCH2
	Kaspáza-7	MCH3, CMH, ICELAP3
Zánětlivé	Kaspáza-1	ICE
	Kaspáza-4	ICH2, TX, ICERII
	Kaspáza-5	ICERIII, TY
	Kaspáza-11	-
	Kaspáza-12	-
	Kaspáza-13	ERICE
	Kaspáza-14	MICE

Iniciátorové kaspázy vlastní dlouhou prodoménu, která obsahuje jeden ze dvou charakteristických protein-protein interakčních motivů – DED (death effector domain), který vlastní kaspáza-8 a kaspáza-10, nebo CARD doménu (caspase activation and recruitment domain), která je typická pro kaspázu-1, -2, -4, -5, -9, -11 a -12 (Degterev et al., 2003). Tyto domény poskytují základ pro interakci s adaptorovými molekulami a vedou k aktivaci dalších komponent apoptotické kaskády. Na druhou stranu, proteázy, které se nazývají efektorové, jsou charakteristické přítomností krátké prodomény. Mezi tyto proteázy se řadí kaspáza-3, -6 a -7.

Aktivní kaspáza je homodimer, který se skládá ze dvou monomerních jednotek (obr. 3). Každá tato monomerní jednotka obsahuje velkou (20 kDa) a malou podjednotku (10 kDa) (Degterev et al., 2003). Monomerní jednotky jsou tvořeny šesti antiparalelními řetězci. Aktivní enzym tedy sestává z dvanácti řetězcového β skládaného listu. Aktivní centra, která jsou součástí každého monomeru, jsou tvořena čtyřmi smyčkami a umístěna na opačných koncích β listu (Shi, 2002).



Obr. 3: Strukturní rysy kaspáz (převzato z Shi, 2002). Kaspázy jsou homomerní molekuly tvořené malou (oranžová) a velkou (modrá) podjednotkou. Čtyři smyčky – L1, L2, L3 a L4, tvoří aktivní centra enzymu. Konformace aktivních center jsou evolučně konzervované u všech známých kaspáz. Konformace L1 a L3 smyčky jsou poměrně stálé, zatímco L2 a L4 smyčka vykazují celkem velkou variabilitu. L2' je součástí sousedního monomeru a hraje rozhodující roli ve stabilizaci správné konformace L2 a L4 smyčky.

Kaspázy štěpí některé mediátory apoptózy, které patří do Bcl-2 rodiny apoptotických proteinů, a to jak členy proapoptotické, tak antiapoptotické. Ze skupiny proapoptotických proteinů je štěpen kaspázou-8 protein Bid, který je poté jako tBid, což je zkrácená forma proteinu s koncovou COOH doménou, translokován z cytosolu do mitochondrií. Tato translokace způsobuje oligomerizaci proapoptotických proteinů Bax a Bak (Korsmeyer et al., 2000) a má za následek uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následné šíření apoptotického signálu (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

Mimoto také kaspázy štěpí, a ve většině případů tím inaktivují, antiapoptotické proteiny. Například antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-x_L jsou štěpeny mezi jejich N-koncovou BH4 a BH3 doménou. Toto štěpení má za následek přeměnu těchto antiapoptotických proteinů na proapoptotické faktory (Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998).

Dalšími substráty kaspáz mohou být různé protein kinázy. Některé z nich jsou zapojeny v inhibici apoptózy, zatímco jiné se mohou účastnit posilování a potenciace programované buněčné smrti. Nejvýznamnějším cílem kaspáz je serin-treoninová protein kináza Akt, která různými mechanismy zprostředkuje buněčné přežívání. Jedním z těchto mechanismů je fosforylace BH3-only proapoptotického proteinu z rodiny Bcl-2, Bad, na Ser-136. Tato fosforylace umožní spojení fosforylované formy Bad s proteinem 14-3-3, čímž zabrání navázání proteinu Bad na antiapoptotický protein Bcl-2 nebo Bcl-x_L, a tím pomáhá buňce přežít (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997).

Kromě kaspáz se na apoptotické buněčné smrti podílejí také jiné proteázy. Například granzym B, serinová proteáza, se podílí na štěpení a aktivaci některých kaspáz. Granzym B přímo aktivuje kaspázu-3, a tím rovnou dochází k navození exekuční fáze apoptózy (Goping et al., 2003; Quan et al., 1996). Jedním, ale pravděpodobně ne jediným, substrátem kaspázy-3, která je aktivovaná granzymem B, je PARP. Jeho štěpení vede k inhibici reparace DNA, aktivaci endonukleázy, depleci ATP a nakonec k apoptóze (Darmon et al., 1995). Další enzymy účastníci se programované buněčné smrti, kalpains, jsou cytosolické proteázy, jejichž aktivace je závislá na Ca²⁺ iontech (Sorimachi et al., 1997). Kathepsiny, proteázy nacházející se primárně v lysozomech, jsou během apoptózy translokovány do cytoplasmy, kde působí jako efektorové kaspázy (Leist and Jaattela, 2001).

6.3.2.1 Měření aktivity kaspáz

Indukce apoptózy je téměř vždy spojena s aktivací klíčových enzymů, kaspáz. Je několik možností, kterými se dá měřit kaspázová aktivita. Nejobvyklejší a nejběžnější způsob měření kaspázové aktivity zahrnuje použití chromogenních či fluorogenních peptidových

substrátů, které po štěpení kaspázami na aspartátu uvolní chromogenní či fluorescenční značku (Kumar, 2004). Minimálním požadavkem pro substrát kaspáz je tetrapeptidová sekvence s aspartátem v P1 pozici. V pozicích P2, P3 a P4 se mohou vyskytovat libovolné aminokyselinové zbytky v závislosti na specifitě jednotlivých kaspáz (Talanian et al., 1997; Thornberry et al., 1997). Většina ze substrátů kaspázy-3 obsahuje peptidovou sekvenci DEVD, přičemž štěpení nastává za druhým aspartátem (Wang et al., 2005).

Nejběžněji používané komerčně dostupné substráty, které jsou založené na kumarínových barvivech, jsou konjugované s fluorochromy AMC a AFC nebo chromoforem pNA. Fluorescence (v případě fluorochromů AMC a AFC) a absorbance (v případě chromoforu pNA) je měřena na spektrofotometrech při odpovídajících vlnových délkách (Kohler et al., 2002).

Nedávno byl vyvinut nový fluorescenční substrát N-Ac-DEVD-N'-MC-R110, který slouží pro stanovení aktivity kaspázy-3 (Wang et al., 2005). Tento substrát navíc nevykazuje omezení, která jsou pozorována u substrátů založených na kumarínových barvivech. Nový substrát N-Ac-DEVD-N'-MC-R110 je vysoce fluorescentní, má vyšší excitační a emisní vlnovou délku a vytváří menší signál pozadí (Wang et al., 2005).

Dodnes bylo identifikováno více než 400 různých substrátů kaspáz. Mezi tyto substráty patří například strukturní cytoskeletární proteiny fodrin a spektrín (Martin et al., 1996; Wang et al., 1998), různé regulátory transkripce a translace (Rouaux et al., 2003), kinázy či proteiny z rodiny Bcl-2.

6.3.3 Apoptóza kardiomyocytů

Interakce mezi různými proapoptotickými a antiapoptotickými molekulami jsou komplexní. Apoptóza může být v myokardu iniciována v mitochondriích, které uvolní cytochrom c do cytosolu v odpovědi na vnější stimuly, jako je například oxidativní poškození. Popřípadě může být apoptóza spuštěna přes endogenní receptory smrti, což vede k vnitřní signalizaci. Oba dva mechanismy se sbíhají v jednom bodě, kde dochází k finálním morfologickým a biochemickým změnám, které jsou pro apoptózu specifické (Kang and Izumo, 2003).

Je zřejmé, že proteiny z rodiny Bcl-2 a MPTP jsou důležité regulátory mitochondriální (vnitřní) apoptotické signální dráhy, která je v kardiomyocytech aktivována stresem (Gustafsson and Gottlieb, 2008).

Srdeční myocyty podléhají apoptóze v odpovědi na nesčetné množství stimulů. Jedním ze stimulů může být hypoxie (Tanaka et al., 1994; Kang et al., 2000). Ve studii, kterou uskutečnil Tanaka se svými spolupracovníky, byly kultury neonatálních

kardiomyocytů kultivovány za hypoxických podmínek, v N_2 a CO_2 atmosféře. Za těchto podmínek docházelo k fragmentaci DNA, která je typická pro programovanou buněčnou smrt. Také přitom docházelo ke zvýšené expresi Fas antigenu, což naznačuje, že apoptóza kardiomyocytů může být zprostředkována v hypoxickém prostředí pomocí Fas antigenu (Tanaka et al., 1994). Ve druhé studii byly kardiomyocyty také kultivovány v hypoxickém prostředí a poté následovala reoxygenace. Během této reoxygenace docházelo k uvolňování cytochromu c do cytosolu a k aktivaci kaspázy-3 a kaspázy-9, což naznačuje, že šlo o vnitřní signální dráhu apoptózy, která je závislá na mitochondriích (Kang et al., 2000).

Dalším stimulem, který může vyvolat apoptotickou buněčnou smrt, jsou ROS. Po expozici H_2O_2 a O_2^- byly pozorovány v kardiomyocytech změny, které nasvědčovaly apoptóze (von Harsdorf et al., 1999). V tomto experimentu bylo také prokázáno, že různé ROS spouští apoptotickou buněčnou smrt jiným mechanismem. V obou případech docházelo ke zvýšení hladiny proteinu p53, který je zodpovědný za reparaci DNA. V případě, že poškozené místo nelze opravit, buňka podlehně programované buněčné smrti. H_2O_2 zvyšoval expresi proteinu Bad, dále vyvolal translokaci proteinů Bax a Bad do mitochondrií, kde docházelo k tvorbě heterodimerů s proteinem Bcl-2, což bylo následováno uvolněním cytochromu c do cytosolu, aktivací kaspázy-3 a štěpením PARP. O_2^- spouštěl buněčnou smrt aktivací kaspázy-6, která poté štěpila svůj substrát, lamin A (von Harsdorf et al., 1999).

Opioidy mohou prostřednictvím vazby na OR ovlivňovat programovanou buněčnou smrt. Barrère-Lemaire se svými kolegy zjistili, že morfin napodobuje antiapoptotický účinek preconditioningu prostřednictvím uvolnění Ca^{2+} (Barrère-Lemaire et al., 2005).

V apoptóze také hrají významnou roli různé kinázy. Jednou z nich je JNK, která ovlivňuje některé apoptotické proteiny. JNK například fosforyluje Bcl-2 protein v G_2/M fázi buněčného cyklu, a tím ho inaktivuje (Yamamoto et al., 1999). Další apoptotický protein, který je regulován JNK kinázou, je Bad. Bad je touto kinázou fosforylován na Ser-128 a programovaná buněčná smrt nastává vnitřní signální dráhou (Donovan et al., 2002). JNK je schopná štěpit také protein Bid, čímž vytváří produkt jBid. Toto štěpení nastává v blízkosti N-terminálního konce a je nezávislé na kaspáze-8. Po translokaci jBid do mitochondrií dojde k preferenčnímu uvolnění Smac, což vede k indukci apoptózy (Deng et al., 2003).

Dalším důležitým enzymem je PKC. Je mnoho důkazů, že různé izoformy PKC působí programovanou buněčnou smrt srdečních myocytů a vykazují jak proapoptotické, tak antiapoptotické účinky (Baines and Molkentin, 2005). Výzkumy jsou zaměřeny především na dvě izoformy – PKC δ a PKC ϵ . Tyto dvě izoformy vykazují opačné účinky na buněčné přežívání a buněčnou smrt i přes to, že mají velmi podobnou strukturu. PKC δ translokuje

z cytosolu do mitochondrií, následkem čehož se uvolní cytochrom c. Tato izoforma působí tedy proapoptoticky (Majumder et al., 2000). Naopak PKC ϵ se přímo váže na VDAC a fosforyluje ho. Tím inhibuje otevření MPTP póru a vykazuje kardioprotektivní účinky (Baines et al., 2003). PKC ϵ také reguluje proteiny z rodiny Bcl-2. Protein Bad je fosforylován pomocí PKC ϵ -ERK komplexu a tím je inaktivován (Baines et al., 2002).

Kardioprotekce zprostředkovaná PKC ϵ byla pozorovaná (Baines et al., 2002; Baines et al., 2003; Murphy and Steenbergen, 2008). Také bylo zjištěno, že kardioprotekce zprostředkovaná pomocí PKC ϵ může být spojena s aktivací antiapoptotické kinázy Akt (Zhou et al., 2002). Akt je jedna z nejlépe popsáných kináz, které se účastní přežití buňky. Její aktivací dochází k zachování mitochondriální integrity, a tím k ochraně kardiomyocytů před apoptotickou i nekrotickou buněčnou smrtí (Miyamoto et al., 2009).

7. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo studium exprese vybraných proapoptotických a antiapoptotických proteinů v srdeční tkáni potkana po podání různých dávek morfinu. Ze skupiny proapoptotických proteinů byly studovány proteiny AIF, Bax, Bid a Bak. Zkoumaným antiapoptotickým proteinem byl Bcl-2. Exprese jmenovaných proteinů byla stanovena SDS-PAGE elektroforézou a metodou Western blotting.

Dalším cílem byla identifikace enzymů účastnících se apoptotického procesu. Zde se jednalo o zjištění, zda dochází v srdeční tkáni po podání morfinu ke změnám v expresi vybraných enzymů zapojených v programované buněčné smrti. Exprese Akt 1/2/3, GSK-3 β a kaspázy-3 byla zjišťována pomocí SDS-PAGE a následného Western blottingu.

V neposlední řadě bylo cílem práce stanovení aktivity kaspázy-3 v srdeční tkáni potkana po podání 10 mg/kg morfinu po dobu 10 dní. Aktivita byla stanovena za pomoci fluorescenčního substrátu N-Ac-DEVD-N'-MC-R110 měřením fluorescence při odpovídající vlnové délce.

8. Materiál a metody

8.1 Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti samci potkanů kmene Wistar. Pokusným zvířatům byly podávány různé dávky morfinu po určitou dobu. Jedna skupina byla kontrolní. Potkani byli usmrceni a jejich srdce byla vyjmuta a rozdělena na levou komoru, pravou komoru a síně. Jednotlivé části byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80°C. K našim pokusům byly použity levé komory (LV) srdeční tkáně. Přehled o dávkách morfinu, počtu potkanů a hmotnosti LV srdeční tkáně v jednotlivých skupinách podává Tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled o dávkách morfinu, počtu laboratorních zvířat a hmotnosti srdeční tkáně

	C	M1	M0,1	RM	M10
dávka morfinu	-	1 mg/kg (28 dní)	0,1 mg/kg (28 dní)	1 mg/kg (28 dní), týden abstinence	10 mg/kg (10 dní)
počet potkanů	13	14	14	14	19
hmotnost LV	6,98 g	7,68 g	7,40 g	8,00 g	6,50 g

C – kontrolní skupina; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden; M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den

8.2 Homogenizace a frakcionace myokardu

Srdeční tkáň jsme zpracovali s použitím uvedených roztoků způsobem popsaným v pracovním postupu.

8.2.1 Roztoky

Přehled pufrů potřebných k homogenizaci a frakcionaci srdeční tkáně udává Tabulka 3.

Tabulka 3: Roztoky používané při homogenizaci a frakcionaci myokardu

Pufr TME	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA
Homogenizační pufr TMES	20 mM Tris (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 250 mM sacharóza
Percoll	18%, naředěný v homogenizačním pufru TMES

8.2.2 Pracovní postup

K srdeční tkáni jsme přidali homogenizační pufr TMES a inhibitor proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, na 1 g tkáně 4 ml TMES pufru), tkáň jsme nastříhali nůžkami na co možná nejmenší kousky. Poté jsme tkáň homogenizovali na přístroji Ultra-Turrax po dobu 15 sekund a následně pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (pohybem pístu 10krát nahoru a dolů). Homogenát jsme stočili na centrifuze (Hettich Universal R30) při 4°C po dobu 10 minut (2100 rpm, tj. 600 x g). Po stočení jsme odebrali supernatant, který jsme dále uchovávali na ledu. Pelet jsme resuspendovali v homogenizačním pufru TMES s inhibitorem proteáz a opět homogenizovali pomocí sklo-teflonového homogenizátoru. Tento homogenát jsme také stočili na centrifuze při 4°C po dobu 10 minut (2100 rpm, tj. 600 x g). Supernatant jsme odebrali a spojili s předchozím. Do centrifugačních kyvet jsme připravili Percollový gradient (20 ml do každé centrifugační kyvety), na který jsme nanесли 3 ml supernatantu. Centrifugační kyvety jsme vyvážili a centrifugovali v centrifuze Beckman-Coulter 15 minut při 26000 rpm (tj. 60000 x g). Ze zbylého supernatantu jsme odebrali alikvot na stanovení proteinů a supernatant jsme rozpipetovali do mikrozkušavek a zamrazili v tekutém dusíku.

Po čtvrt hodinové centrifugaci se v centrifugačních kyvetách vytvořily jednotlivé vrstvy, které jsme postupně odebírali. Nejprve jsme odebrali horní vrstvu pro přípravu cytosolické frakce (CYT). Odebranou část jsme rozdělili do malých zkušavek, přesně vyvážili na analytických vahách a poté centrifugovali 1 hodinu při 300000 g (centrifuga Beckman-Coulter). Od peletu jsme oddělili supernatant (= CYT), který jsme rozpipetovali do mikrozkušavek a zamrazili v tekutém dusíku. Opět jsme si nechali alikvot na stanovení proteinů ve vzorku.

Z frakce PM jsme opatrně odebrali 3 ml, které jsme naředili v pufru TME. To samé jsme provedli i s frakcí obohacenou mitochondriemi (MITO). Naředěné frakce jsme

rozpipetovali po 25 ml do centrifugačních kyvet a dali centrifugovat na 1 hodinu při 150000 g a 4°C (centrifuga Beckman-Coulter). Po centrifugaci jsme odsáli supernatant a pelet jsme resuspendovali v pufru TME. Odebrali jsme alikvoty na stanovení proteinů a zbytek jsme rozpipetovali do mikrozkušavek a zamrazili v tekutém dusíku.

Pelet, který jsme uchovávali na ledu, jsme resuspendovali v TME pufru a sonikovali ve zkumavce umístěné na ledu ultrazvukem 3krát po dobu 10 sekund. Poté jsme odebrali alikvot pro stanovení proteinů a zbytek byl rozpipetován do mikrozkušavek a zamrazen v tekutém dusíku.

8.3 Stanovení proteinů

Proteiny ve vzorcích jsme stanovovali metodou BCA (Bicinchoninic acid protein assay). Tato metoda byla popsána Simpsonem a Williams-Smithem v roce 1975 a modifikována Stoscheckem v roce 1990. BCA metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové. Principem metody je reakce peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek. Měďnaté ionty se redukují na měďné a ty jsou komplexovány sodnými solemi kyseliny bicinchoninové. Vytvoření komplexů měďných iontů se projeví fialovým zbarvením.

8.3.1 Roztoky

Ke stanovení proteinů ve vzorcích myokardu pomocí BCA metody jsme používali roztoky uvedené v Tabulce 4.

Tabulka 4: Roztoky používané ke stanovení proteinů

Roztok A	8 g Na ₂ CO ₃
	1,6 g vlnanu sodného
	doplnit do 100 ml dH ₂ O
	upravit pH na 11,25
Roztok B	4 g BCA
	doplnit do 100 ml dH ₂ O
Roztok C	0,4 g CuSO ₄ · 5 H ₂ O
	10 ml dH ₂ O

8.3.2 Pracovní postup

Nejprve jsme si z BSA standardu o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ připravili BSA standard o koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Takto připravené standardy jsme napipetovali do jamek na mikrotitrační destičce podle Tabulky 5.

Tabulka 5: Standardy BSA o různých koncentracích

standard	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μl	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) μl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
dH ₂ O μl	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

BL – blank; BSA – bovinní sérový albumin

Vzorky pro stanovení bílkovin jsme zředili v poměru 1:99, k 10 μl vzorku jsme přidali 990 μl dH₂O. Celkový objem byl 1000 μl . Takto připravené vzorky jsme pipetovali do jamek na mikrotitrační destičce v tripletech po 100 μl . Smísením roztoků C, B a A v tomto pořadí v poměru 1:25:26 byla připravena pracovní směs. Do každé jamky ke standardům i vzorkům jsme napipetovali 100 μl pracovní směsi a mikrotitrační destička byla inkubovaná při teplotě 60°C po dobu 30 minut. Absorbance vzorků byla změřena na přístroji Synergy HT v programu Gen5 při vlnové délce 562 nm. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena podle kalibrační křivky.

8.4 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na mnoha faktorech, kterými jsou například velikost celkového povrchového náboje, velikost a tvar molekuly, stupeň denaturace proteinu či posttranslační modifikace proteinu.

SDS-PAGE elektroforéza využívá solubilizační schopnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Dodecylsulfát sodný je solubilizační činidlo a detergent, který obalí proteiny a denaturuje je. Díky SDS mají všechny proteiny stejnou hustotu negativního povrchového náboje a jejich pohyblivost závisí téměř výhradně na jejich molekulové hmotnosti.

8.4.1 Roztoky

Roztoky uvedené v Tabulce 6 jsme používali pro přípravu standartních gelů a SDS-PAGE elektroforézu.

Tabulka 6: Pufry potřebné pro SDS-PAGE elektroforézu

Buffer 1	18,17 g Tris-HCl
(Lower Buffer; 1,5M Tris-HCl; pH 8,8)	doplnit dH ₂ O do 100 ml
Buffer 2	6,05 g Tris-HCl
(Upper Buffer; 0,5M Tris-HCl; pH 6,8)	doplnit dH ₂ O do 100 ml
30% akrylamid	30 g akrylamidu
(0,8% N,N-methylenbisakrylamid)	0,8 g N,N-methylenbisakrylamidu
	doplnit dH ₂ O do 100 ml
Running Buffer 10x konc.	30,3 g Tris-HCl
(promývací puf)	141,1 g glycinu
	10 g SDS
	doplnit dH ₂ O do 1000 ml
Laemmliho pufr 4x konc.	2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)
	1 ml glycerolu
	0,8 g SDS
	0,8 g DTT nebo 0,4 ml merkaptoethanolu
	1 mg bromfenolové modři
	doplnit dH ₂ O do 10 ml

8.4.2 Pracovní postup

Nejprve jsme si sestavili aparaturu Mini Protean II (BioRad) a očistili skla ethanolem. Poté jsme si s použitím roztoků, které jsou uvedené v Tabulce 6, připravili dělicí gel. Složení dělicího gelu znázorňuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Složení dělicích SDS-polyakrylamidových gelů

	10%	12%	15%
dH ₂ O	8 ml	6,7 ml	4,7 ml
Buffer 1	5 ml	5 ml	5 ml
30% akrylamid	6,7 ml	8 ml	10 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
10% APS	90 µl	90 µl	90 µl

Podle velikosti studovaných molekul byly použity dělicí SDS-polyakrylamidové gely o různé hustotě. Dělicí gel jsme napipetovali mezi očištěná skla a převrstvili buthanolem

nasyceným vodou. Nechali jsme gel polymerovat přibližně 1 hodinu a poté jsme si připravili 4% zaostřovací gel. Jeho složení udává Tabulka 8.

Tabulka 8: Složení 4% zaostřovacího gelu.

dH ₂ O	6 ml
Buffer 2	2,5 ml
30% akrylamid	1,3 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	8 µl
10% APS	90 µl

Do zaostřovacího gelu jsme vložili hřebínek a nechali přibližně 30 minut polymerovat. Mezitím jsme si připravili vzorky. Používali jsme vzorky postnukleárního supernatantu, které jsme zředili s dH₂O a Laemmliho pufrem. Vzorky jsme poté denaturovali povařením 3 minuty při teplotě 95°C.

Poté jsme opatrně vyjmuli hřebínky z gelu, do nádoby na elektroforézu nalili promývací pufř a pipetami nanášeli do vzniklých jamek připravené vzorky. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V přibližně 1 hodinu.

8.5 Western blotting a imunodetekce

Při metodě Western blotting dochází k přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu v blotovacím pufru. Pro vizualizaci proteinů na nitrocelulózové membráně jsme použili metodu imunodetekce. Pufry potřebné k těmto metodám udává Tabulka 9.

8.5.1 Roztoky

Tabulka 9: Pufry potřebné pro Western blotting.

TGM Buffer	15 g Tris
(blotovací pufr)	72 g glycinu
	1000 ml methanolu
	doplnit dH ₂ O do 5000 ml
TBS Buffer; pH 8; 10x konc.	84,15 g NaCl
	11,63 g Tris
	doplnit dH ₂ O do 960 ml
	upravit pH na 8
Washing Buffer	100 ml TBS Buffer
(oplachovací pufr)	900 ml dH ₂ O
	3 ml Tween
Blocking Buffer	2,5 g sušeného mléka
(blokovací pufr)	5 ml TBS Buffer
	45 ml dH ₂ O
	50 µl Tween
Diluting Buffer	0,5 g sušeného mléka
(ředící pufr)	5 ml TBS Buffer
	45 ml dH ₂ O
	50 µl Tween

8.5.2 Pracovní postup

Gel po proběhlé elektroforéze jsme přiložili na nitrocelulózovou membránu a dali do blotovacího zařízení. Působením elektrického proudu po dobu 1 hodiny při konstantním napětí 100 V došlo k přenesení proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu. Poté jsme membránu protáhli vodou a inkubovali v blokovacím pufru. V TBS pufru jsme naředili primární protilátky a nitrocelulózovou membránu jsme v těchto protilátkách inkubovali přes noc. Přehled primárních a sekundárních protilátek používaných v této práci udává Tabulka 10. Druhý den jsme slili protilátky a membránu jsme důkladně promyli ve vodě a poté jsme ji 3x 10 minut promývali v oplachovacím pufru. Po promytí jsme membránu inkubovali po dobu 1 hodiny v sekundárních protilátkách. Následně jsme membránu opět důkladně promyli ve vodě a poté 3x v oplachovacím pufru.

Pro vizualizaci proteinů jsme membránu inkubovali 1 minutu s roztokem peroxidu vodíku a luminolu. Poté jsme membránu exponovali na film a vyvolali.

Tabulka 10: Seznam primárních a sekundárních protilátek, které byly pro pokusy použity.

Proapoptotické proteiny				
primární protilátka	katalogové číslo	ředění	sekundární protilátka	ředění
AIF	sc-5586	5000x	Anti-Rabbit	40000x
Bak	sc-832	500x bez mléka	Anti-Rabbit	40000x
Bax	sc-65532	500x bez mléka	Anti-Mouse	20000x
Bid	sc-56025	500x bez mléka	Anti-Mouse	20000x

Antiapoptotický protein				
Bcl-2	sc-65392	500x bez mléka	Anti-Mouse	20000x

Enzymy související s apoptózou				
Kaspáza-3	sc-7272	500x bez mléka	Anti-Mouse	20000x
Kaspáza-3p11	sc-22171	500x bez mléka	Anti-Goat	40000x
Akt 1/2/3	sc-8312	2000x	Anti-Rabbit	40000x
GSK 3 β	sc-9166	2000x	Anti-Rabbit	40000x

Pozn.: Expresse některých apoptotických proteinů se dařila detekovat pouze při 500násobném ředění protilátky v TBS pufru bez blokování mlékem.

8.6 Analýza a vyhodnocení

Analýza dat byla prováděna vždy ze tří nezávislých pokusů. Výsledky z SDS-PAGE a Western blottingu byly vyhodnoceny v programu ImageQuant, grafy byly sestaveny v programu GraphPad Prism 6. Pro zjištění statistické významnosti jsme používali jednorozměrnou ANOVU a t-test.

8.7 Stanovení aktivity kaspázy-3

Dalším cílem této práce bylo stanovit v morfinem ovlivněných vzorcích myokardu potkana aktivitu kaspázy-3. Tato proteáza patří mezi efektorové kaspázy, které se účastní konečné fáze apoptózy. Aktivitu kaspázy-3 jsme stanovili pomocí fluorescenčně značeného kitu N-Ac-DEVD-N'-MC-R110 podle níže popsaného pracovního postupu. Složení fluorescenčního kitu pro stanovení aktivity kaspázy-3 ve vzorcích udává Tabulka 11.

Tabulka 11: Caspase-3 Fluorescence Assay Kit.

Název pufru	Množství
Caspase-3 Substrate	100 μ l
Caspase-3 Inhibitor	40 μ l
Caspase-3 Dithiothreitol (1M)	400 μ l
Caspase-3 Assay Buffer	50 ml
Cell-Based Assay Lysis Buffer	10 ml

8.7.1 Laboratorní zvířata

Pro tyto pokusy bylo použito 20 potkanů kmene Wistar. Deseti zvířatům byl podáván morfin v dávce 10 mg/kg na den po dobu 10 dní. K této skupině byla ještě skupina kontrolní, která čítala stejný počet zvířat. Poté byli potkani usmrceni, srdce byla rozdělena na levou komoru, pravou komoru a síně. Tkáň byla zmrazena v tekutém dusíku a uchovávána v mrazáku při -80°C až do doby před vlastním provedením experimentu. Pro stanovení aktivity kaspázy-3 byly použity LV a RV.

8.7.2 Příprava vzorků a pracovní postup

Z částí LV a RV každého srdce byly připraveny samostatné vzorky. Na digitálních vahách jsme navážili přibližně 50-100 mg tkáně z části LV a o něco méně z části RV, protože je menší. Ke každému vzorku jsme přidali Caspase-3 Assay pufr (na 50 mg vzorku/250 μ l Caspase-3 Assay pufru). Přesné hodnoty udává Tabulka 12.

Tkáň jsme nejemno nastříhali nůžkami v odpovídajícím množství Caspase-3 Assay pufru. Vzniklý homogenát jsme centrifugovali po dobu 5 minut rychlostí 3000 rpm. Po centrifugaci jsme odebrali supernatant. K peletě jsme přidali 100 μ l Cell-Based Assay Lysis pufru a zvortexovali. Poté jsme vzorky inkubovali při pokojové teplotě na orbitálním rotoru po dobu 30 minut. Po uplynutí doby inkubace jsme vzorky opět zvortexovali a centrifugovali 10 minut rychlostí 3000 rpm. Supernatant jsme odebrali do 1,5 ml mikrozkušavek a naředili ho v Cell-Based Assay Lysis pufru v poměru 1:4. Poté jsme do jamek na černé mikrotitrační destičce pipetovali 90 μ l každého vzorku v duplikátech podle Tabulky 13.

Tabulka 12: Navážky tkáně a jim odpovídající množství Caspase-3 Assay pufru.

	C	Caspase-3 Assay pufr	M10	Caspase-3 Assay pufr
	(mg)	(μ l)	(mg)	(μ l)
LV 1	102	510	57	275
LV 2	62	310	52	260
LV 3	74	370	60	300
LV 4	54	270	65	325
LV 5	58	290	62	310
LV 6	53	265	45	225
LV 7	49	245	40	200
LV 8	69	345	45	225
LV 9	64	320	63	315
LV 10	45	225	54	270
RV 1	48	240	41	205
RV 2	62	310	32	160
RV 3	34	170	50	250
RV 4	38	190	39	195
RV 5	35	175	35	175
RV 6	35	175	36	180
RV 7	39	195	33	165
RV 8	42	210	34	170
RV 9	32	160	39	195
RV 10	44	220	37	185

Ke každému vzorku na černé mikrotitrační destičce jsme přidali 10 μ l Caspase-3 Assay pufru. Ke dvěma vzorkům jsme přidali 10 μ l roztoku Caspase-3 Inhibitor Solution. Nyní jsme si připravili Caspase-3 substrátový roztok smícháním 100 μ l Caspase-3 substrátu s 400 μ l Caspase-3 dithiothreitolu a 9,5 ml Caspase-3 Assay pufru. Do každé jamky na mikrotitrační destičce jsme napipetovali 100 μ l Caspase-3 substrátového roztoku a destičku jsme inkubovali 30 minut při 37°C.

Tabulka 13: Schema vzorků na mikrotitrační destičce.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	LV1 C	LV1 C	LV2 C	LV2 C	LV3 C	LV3 C	LV4 C	LV4 C	LV5 C	LV5 C	LV1 M10
B	LV1 M10	LV2 M10	LV2 M10	LV3 M10	LV3 M10	LV4 M10	LV4 M10	LV5 M10	LV5 M10	RV1 C	RV1 C	RV2 C
C	RV2 C	RV3 C	RV3 C	RV4 C	RV4 C	RV5 C	RV5 C	RV1 M10	RV1 M10	RV2 M10	RV2 M10	RV3 M10
D	RV3 M10	RV4 M10	RV4 M10	RV5 M10	RV5 M10		BL	BL	LV6 C	LV6 C	LV7 C	LV7 C
E	LV8 C	LV8 C	LV9 C	LV9 C	LV10 C	LV10 C	LV6 M10	LV6 M10	LV7 M10	LV7 M10	LV8 M10	LV8 M10
F	LV9 M10	LV9 M10	LV10 M10	LV10 M10	RV6 C	RV6 C	RV7 C	RV7 C	RV8 C	RV8 C	RV9 C	RV9 C
G	RV10 C	RV10 C	RV6 M10	RV6 M10	RV7 M10	RV7 M10	RV8 M10	RV8 M10	RV9 M10	RV9 M10	RV10 M10	RV10 M10
H	LV 8 C inhib.	LV9 M10 inhib.										

BL – blank (Caspase-3 Assay pufr), C – kontrolní skupina, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den morfinu po dobu 10 dní, inhib. – ke vzorku bylo přidáno 10 μ l Caspase-3 inhibitoru namísto Caspase-3 Assay pufru

8.7.3 Měření aktivity kaspázy-3

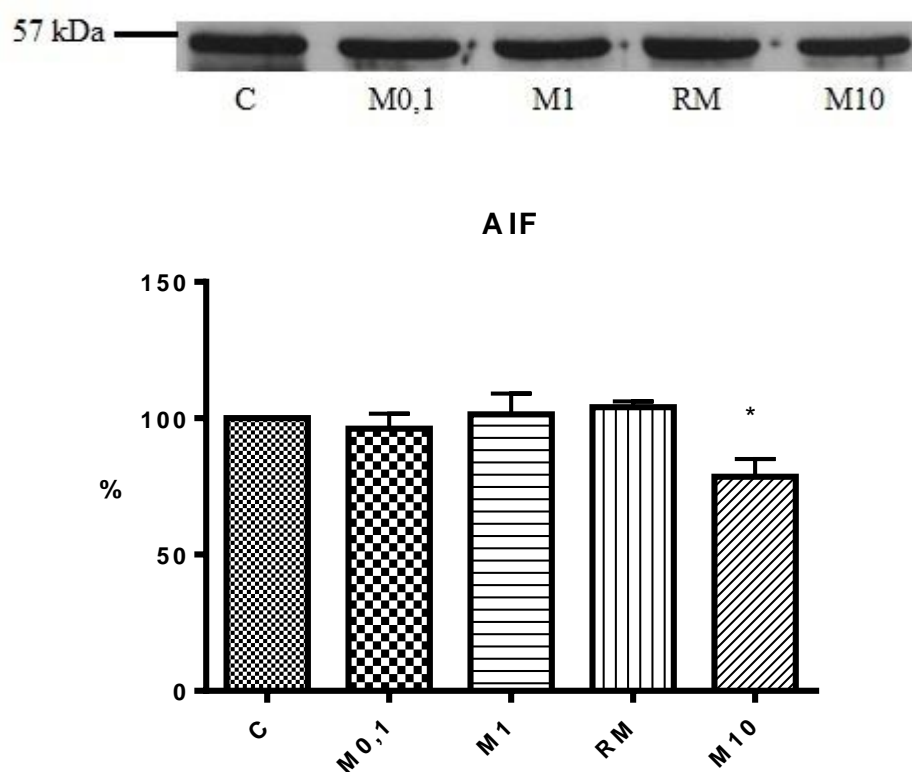
Fluorescenční intenzita v každé jamce byla změřena na přístroji Synergy HT v programu Gen5 za excitace při vlnové délce 485 nm a za emise při 520 nm. Získaná data byla vyhodnocena a grafy sestaveny v programu GraphPad Prism 6. Pro zjištění statistické významnosti byl použit t-test.

9. Výsledky

9.1 Studium exprese proapoptotických proteinů pomocí SDS-PAGE a metody Western blotting

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy, následného Western blottingu a imunodetekce byly detekovány ve vzorcích myokardu potkana po podání různých dávek morfinu vybrané proapoptotické proteiny.

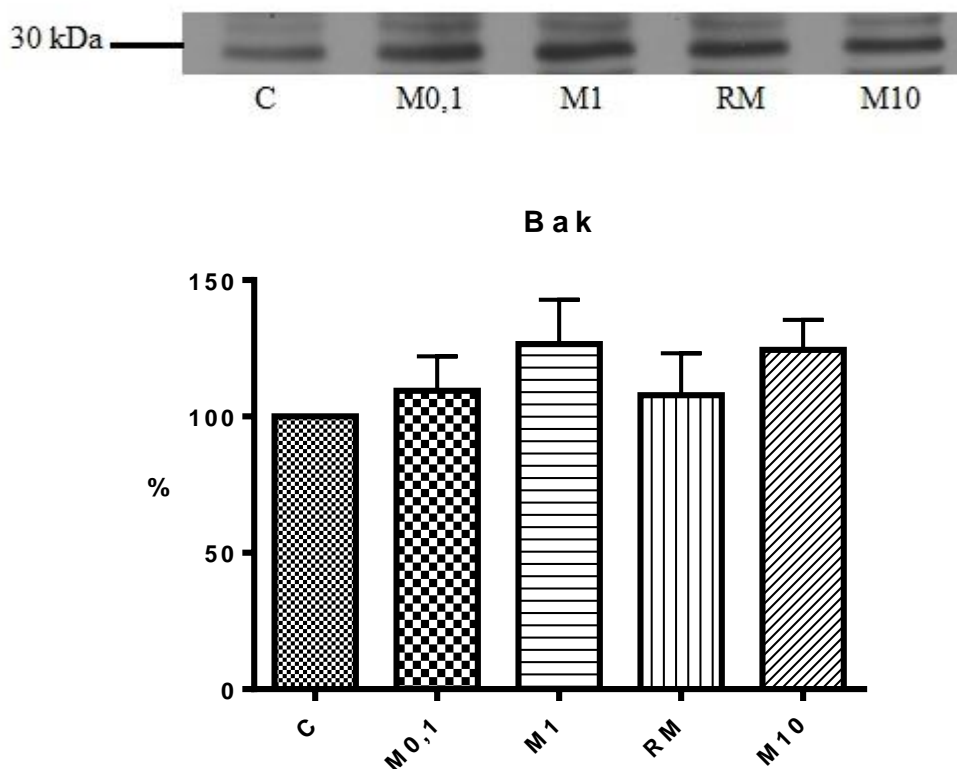
AIF – ve vzorcích myokardu potkana byla zjištěna exprese AIF jak ve vzorcích kontrolní skupiny potkanů, tak ve skupinách, které byly ovlivněny různými dávkami morfinu. Snížení exprese AIF bylo detekováno u dávky 10 mg/kg/den morfinu po dobu 10 dní. Toto snížení bylo signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.



Graf 1: Imunoblot a grafické znázornění exprese proapoptotického proteinu AIF.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese AIF v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

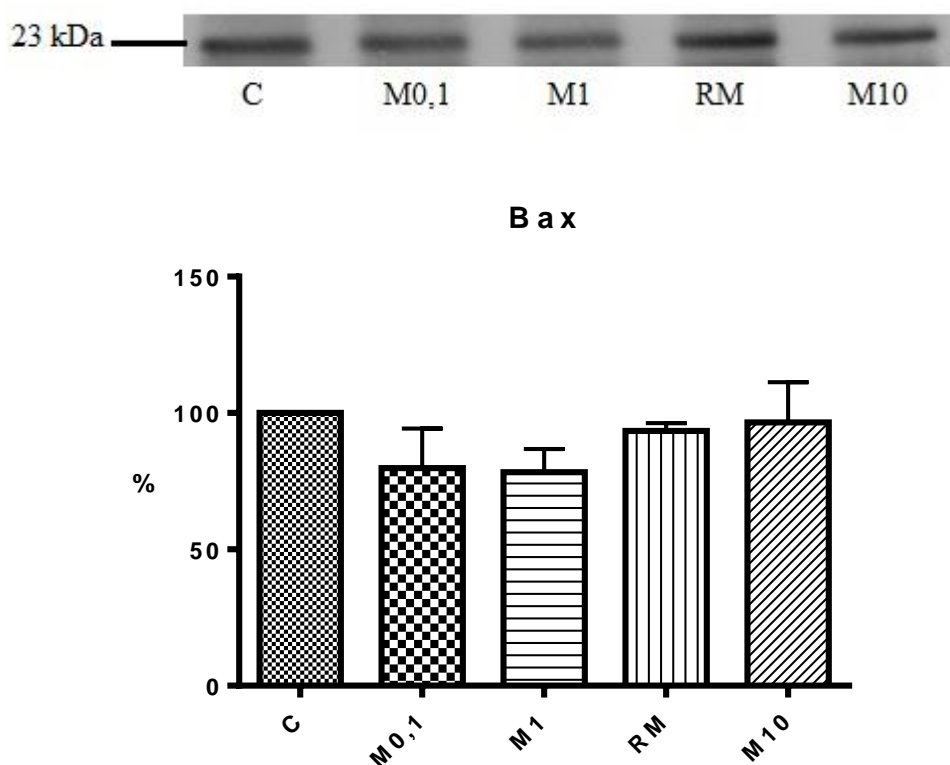
Bak – exprese tohoto proapoptotického proteinu byla ve vzorcích srdeční tkáně také detekována. Detekce *Bak* se nakonec podařila po důkladném promytí membrán dH₂O a při blokování membrán pouze v TBS pufru bez přidání mléka. V tomto případě nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v expresi *Bak* mezi kontrolními a morfinem ovlivněnými vzorky na hladině významnosti $p < 0,05$.



Graf 2: Imunoblot a grafické znázornění exprese proapoptotického proteinu *Bak* v kontrolních a morfinem ovlivněných vzorcích srdce.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden; M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese *Bak* v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

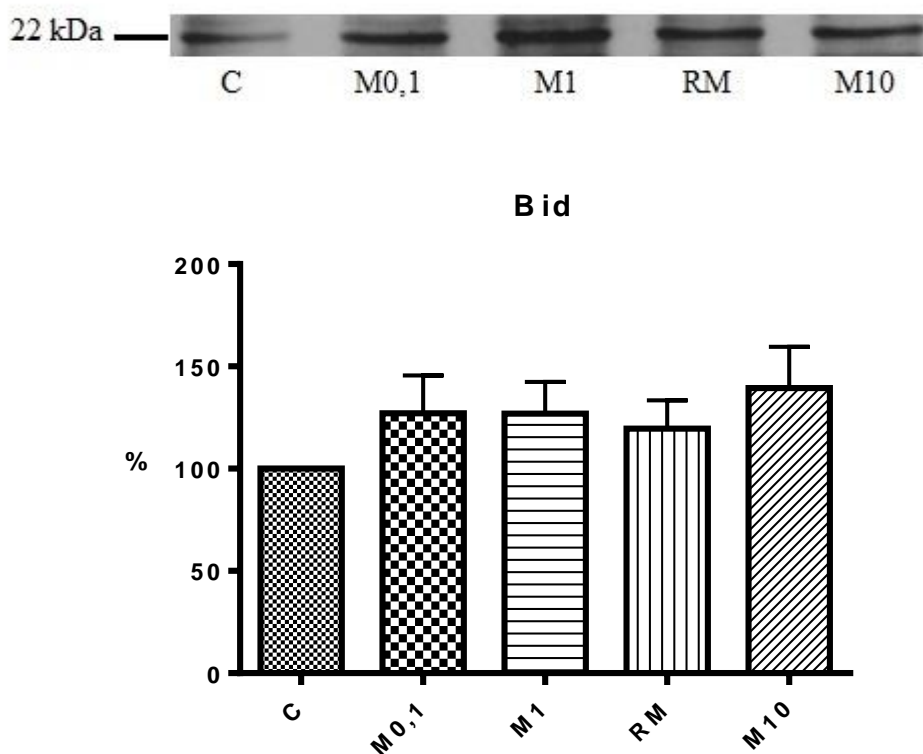
Bax – proapoptotický protein Bax byl ve vzorcích myokardu detekován po důkladném promytí nitrocelulózových membrán dH₂O a po blokování těchto membrán v TBS pufru bez přidání mléka. Po porovnání morfinem ovlivněných vzorků s kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v expresi proapoptotického proteinu v těchto vzorcích ani na hladině významnosti $p < 0,05$.



Graf 3: Imunoblot a grafické znázornění exprese proapoptotického proteinu Bax ve vzorcích kontrolních a morfinem ovlivněných jedinců.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden; M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese Bax v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

Bid – proapoptotický protein Bid byl exprimován jak v kontrolních vzorcích, tak ve vzorcích myokardu, které byly ovlivněné různými dávkami morfinu. Detekce se opět podařila poté, co byly nitrocelulózové membrány důkladně promyty dH₂O a inkubovány v TBS pufru bez přidání mléka. Expres tohoto proteinu se u morfinem ovlivněných vzorků signifikantně nelišila od exprese u kontrolních vzorků ani na hladině významnosti $p < 0,05$.



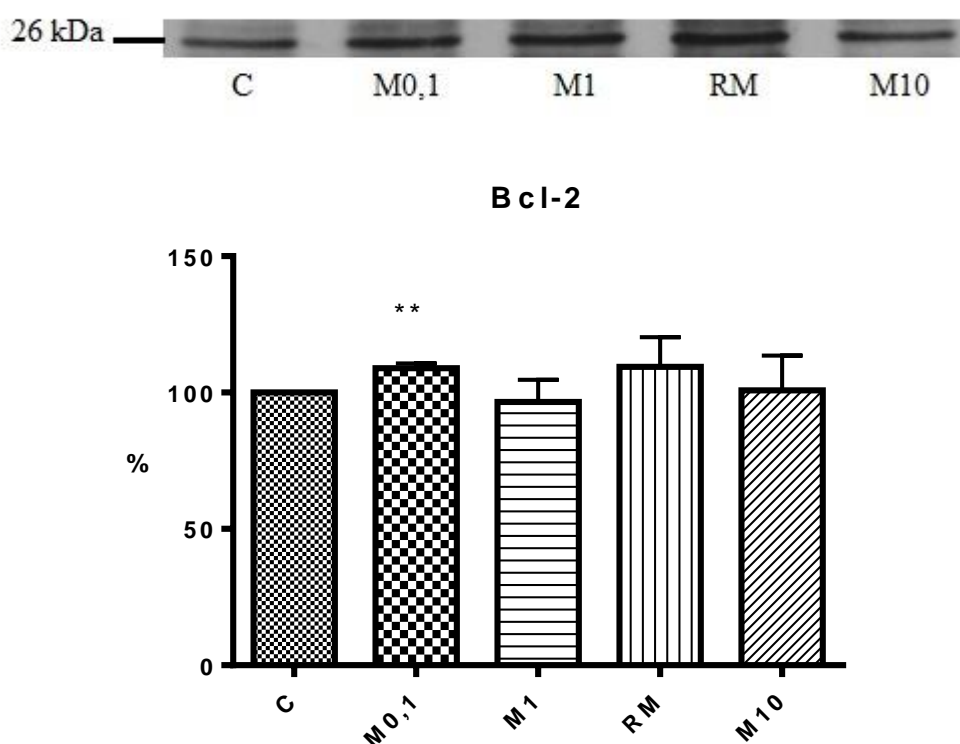
Graf 4: Imunoblot a grafické znázornění exprese proapoptotického proteinu Bid.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese Bid v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

9.2 Studium exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 pomocí SDS-PAGE a metody Western blotting

Ve vzorcích myokardu potkana po podání různých dávek morfinu byla pomocí metod SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce zjištěna také přítomnost proteinu Bcl-2.

Bcl-2 – antiapoptotický protein Bcl-2 byl detekován ve vzorcích myokardu potkana u kontrolních zvířat i u zvířat, která byla ovlivněna různými dávkami morfinu. Detekce se zdařila po důkladném promytí nitrocelulózových membrán dH_2O a po inkubaci v blokovacím pufru bez přidání mléka. Rozdíl v expresi Bcl-2 proteinu mezi kontrolní skupinou a skupinou, které byl podáván morfin v dávce 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní, byl vyhodnocen jako statisticky významný na hladině $p < 0,05$. V případě porovnání ostatních morfinových skupin se skupinou kontrolní nebyly pozorovány signifikantní rozdíly na této hladině.

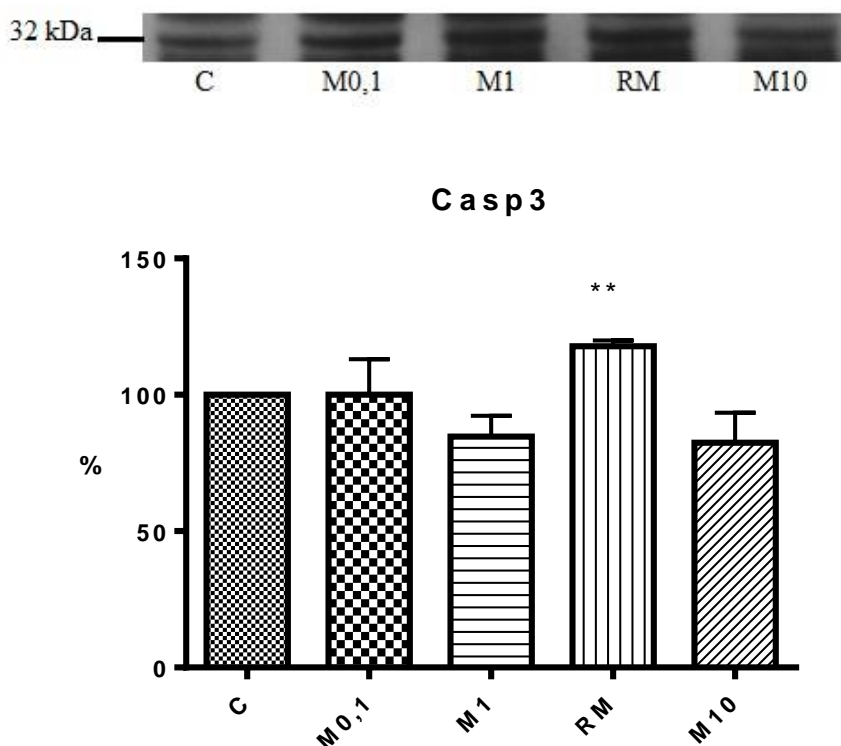


Graf 5: Imunoblot a grafické znázornění exprese Bcl-2 proteinu ve vzorcích myokardu potkana po podávání malých dávek (0,1 mg/kg/den; 1 mg/kg/den) a velké dávky (10 mg/kg/den) morfinu a po 1-týdenní abstinenci. C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese Bcl-2 v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

9.3 Studium exprese enzymů účastnících se apoptotického procesu v myokardu

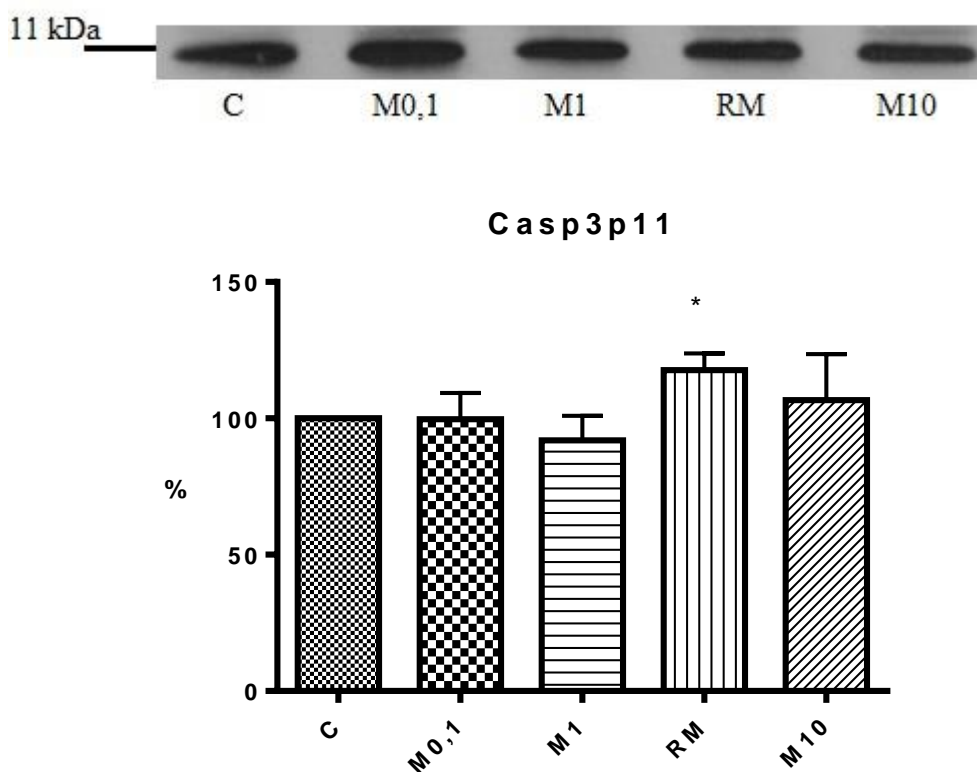
V neposlední řadě byla ve vzorcích myokardu potkanů, kteří byli ovlivněni různými dávkami morfinu, studována exprese vybraných enzymů účastnících se programované buněčné smrti. Jedním z nich byla kaspáza-3, a to jak neaktivní forma, tak její rozštěpená, aktivní, forma. Dalšími enzymy, u kterých byla sledována exprese po podání různých dávek morfinu, byly protein kinázy Akt 1/2/3 a GSK-3 β .

Kaspáza-3 – tento enzym je proteázou hrající klíčovou roli v programované buněčné smrti. Na imunoblotech byla zjištěna podobná exprese kaspázy-3 v kontrolní skupině v porovnání se skupinami, které byly ovlivněny morfinem. Detekce kaspázy-3 se podařila po důkladném promývání nitrocelulózových membrán v dH₂O a po použití TBS blokovacího pufru bez mléka. Z grafického znázornění je zřejmé, že docházelo ke změnám exprese u jednotlivých vzorků. Po použití statistického testu byla zjištěna významnost po podávání dávky 1 mg/kg/den po dobu 28 dní s následnou týdenní abstinencí na hladině $p < 0,05$.



Graf 6: Imunoblot a grafické znázornění exprese kaspázy-3 ve vzorcích myokardu po podání různých dávek morfinu. C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese kaspázy-3 v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrole

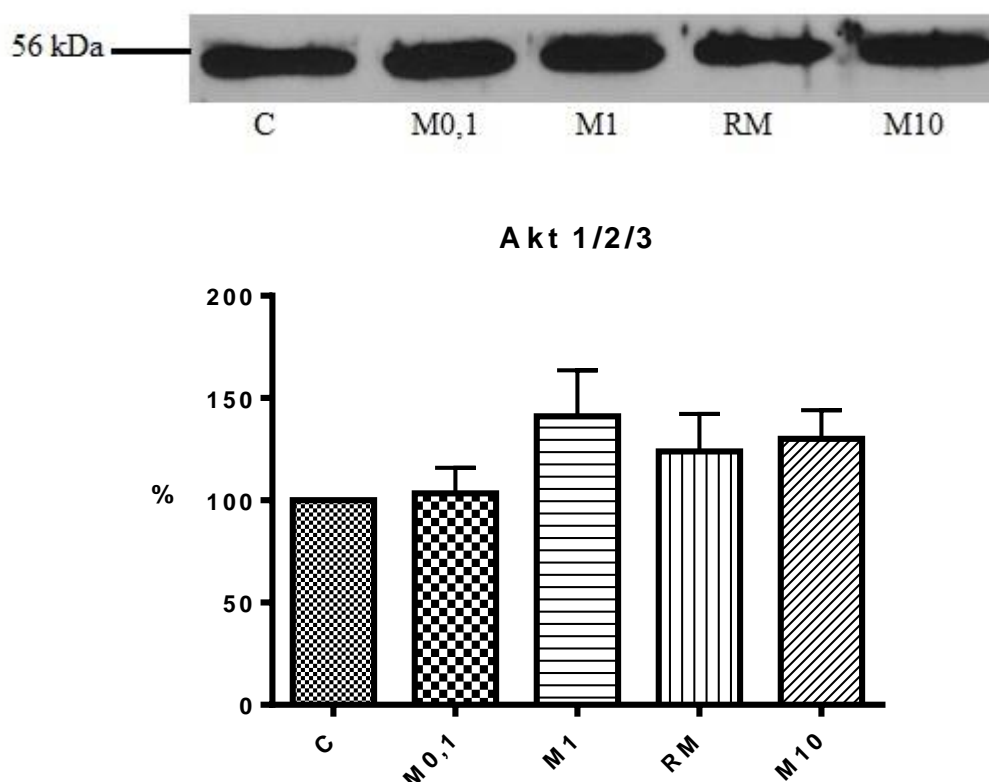
Kaspáza-3p11 – ve vzorcích myokardu byla detekovaná také podjednotka p11, což je podjednotka aktivní kaspázy-3. Aktivace kaspázy-3 nastává po štěpení prekurzoru na Asp-175 (aspartát), tímto dochází k tvorbě p11 podjednotky a peptidu p20. Tento peptid je poté štěpen na Asp-28 a vytváří podjednotku p17. Aktivní kaspáza-3 je heterodimer tvořený ze dvou p17 a dvou p11 podjednotek. Detekce aktivní kaspázy-3 se podařila po důkladném promývání membrán dH₂O a inkubaci v blokovacím TBS pufru bez mléka. Vzorky, které byly ovlivněny morfinem, byly porovnávány s kontrolním vzorkem. V případě podání dávky 1 mg/kg/den po dobu 28 dní s následnou týdenní abstinencí bylo také, jako v případě kaspázy-3, pozorováno signifikantní zvýšení v expresi této podjednotky na hladině významnosti $p < 0,05$. Po porovnání ostatních morfinových skupin se skupinou kontrolní nedocházelo k signifikantním rozdílům na hladině významnosti $p < 0,05$.



Graf 7: Imunoblot a grafické znázornění podjednotky p11 kaspázy-3.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese podjednotky p11 kaspázy-3 v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

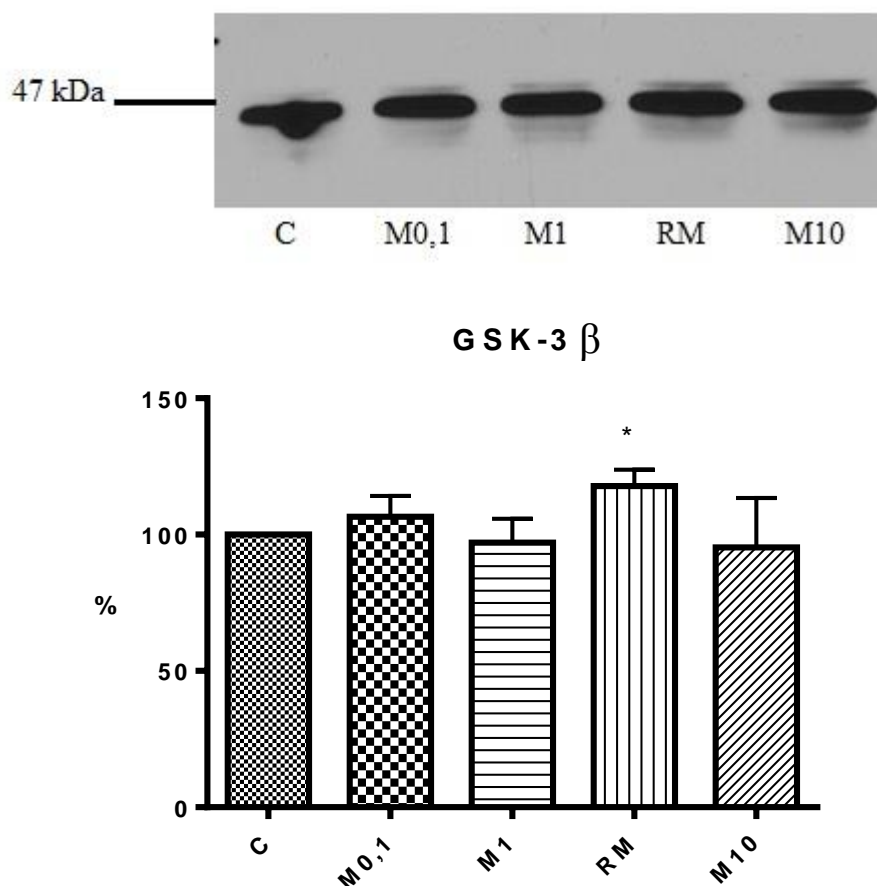
Akt 1/2/3 – tento enzym umožňuje buněčné přežívání různými mechanismy, například fosforylací některých proapoptotických proteinů, čímž dojde ke ztrátě schopnosti těchto proteinů zprostředkovat apoptózu. Byla studována exprese serin-treoninové protein kinázy *Akt 1/2/3* v kontrolních vzorcích myokardu potkana a ve vzorcích po podávání malých (0,1 mg/kg/den; 1 mg/kg/den), velkých (10 mg/kg/den) dávek morfinu a po podávání dávky 1 mg/kg/den s následnou abstinencí po dobu 1 týden. V tomto případě nedocházelo k pozorování žádné signifikantní změny v expresi *Akt 1/2/3* na hladině významnosti $p < 0,05$.



Graf 8: Imunoblot a grafické znázornění exprese *Akt 1/2/3* ve vzorcích myokardu potkana.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese *Akt 1/2/3* v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

GSK-3 β – je známo, že je tato serin-treoninová protein kináza zapojena v regulaci buněčné smrti a buněčného přežívání. Proto byla v této práci studována také exprese *GSK-3 β* . Po srovnání kontrolní skupiny s jednotlivými skupinami, které byly ovlivněné různými dávkami morfinu podávaného po různě dlouhou dobu, bylo pozorováno signifikantní zvýšení v případě krátkodobého podání (10 dní) vysoké dávky morfinu (10 mg/kg/den) na hladině významnosti $p < 0,05$. U ostatních skupin nedocházelo k významným rozdílům v expresi *GSK-3 β* . Statistická významnost byla zamítnuta na hladině $p < 0,05$.



Graf 9: Imunoblot a grafické znázornění exprese serin-treoninové protein kinázy *GSK-3 β* ve vzorcích myokardu po podávání různých dávek morfinu.

C – kontrolní skupina; M0,1 – morfinová skupina s dávkou 0,1 mg/kg/den po dobu 28 dní; M1 – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den po dobu 28 dní; RM – morfinová skupina s dávkou 1 mg/kg/den a následnou abstinencí po dobu 1 týden, M10 – morfinová skupina s dávkou 10 mg/kg/den po dobu 10 dní; procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese *GSK-3 β* v morfinem ovlivněných vzorcích oproti kontrolnímu vzorku

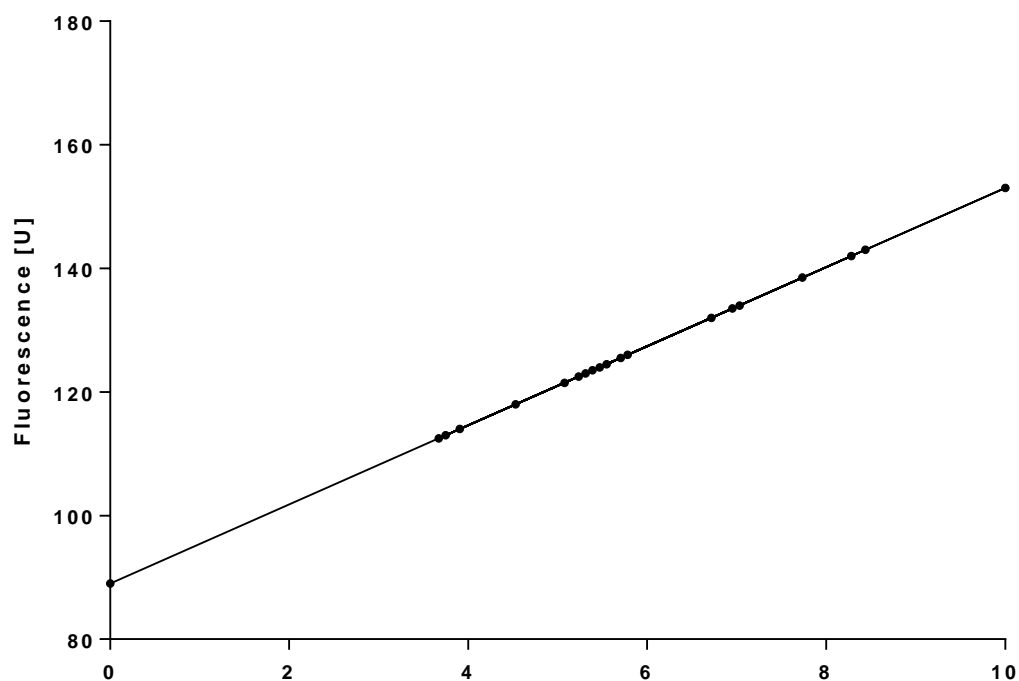
9.4 Stanovení aktivity kaspázy-3 pomocí fluorescenčního substrátu ve vzorcích myokardu potkana

Stanovení aktivity kaspázy-3 ve vzorcích myokardu bylo použito jako doplňující metoda k SDS-PAGE, Western blottingu a imunodetekci. Pomocí této metody jsme se snažili ve vzorcích myokardu potkana po podání dávky 10 mg/kg/den morfinu změřit aktivitu kaspázy-3 a porovnat tuto naměřenou aktivitu s aktivitou u kontrolní skupiny. Aktivita tohoto enzymu byla měřena ve vzorcích LV a RV.

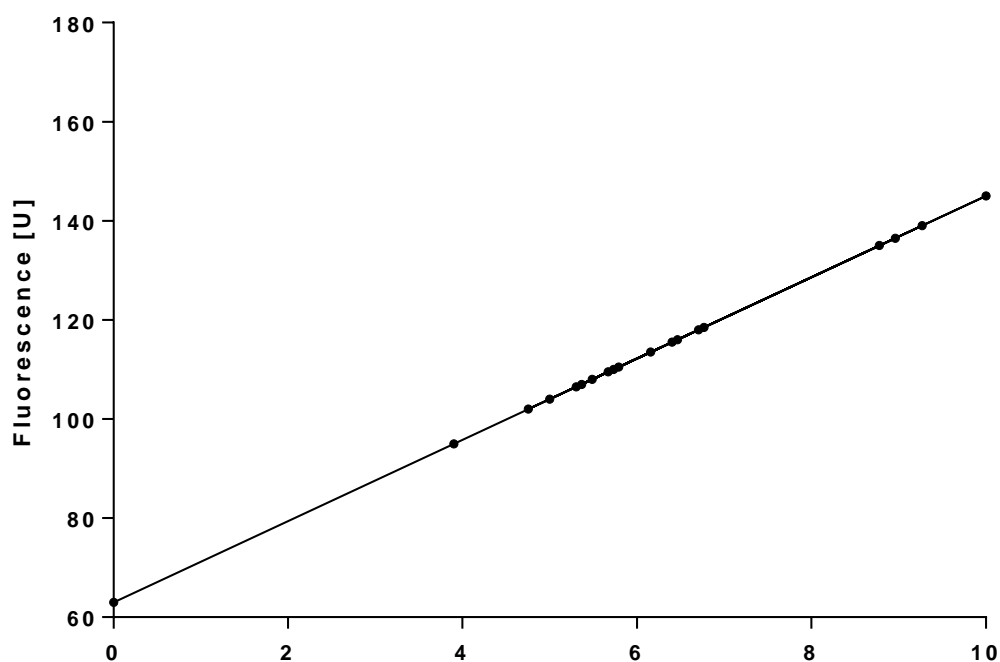
Fluorescenční substrát byl bohužel doručen bez standardu, proto jsme změřenou fluorescenci vztahovali ke koncentraci proteinů, kterou jsme v těchto vzorcích změřili výše popsanou BCA metodou.

Nejprve jsme si zkonstruovali simulovanou kalibrační křivku, u které hodnota blanku leží v bodě nula. Na osu x jsme vynesli hodnoty v rozmezí od 0 do 10 a na osu y byly vyneseny naměřené hodnoty fluorescence. Vzorky byly zpracovávány ve dvou dnech, pro každý den byla sestrojena vlastní simulovaná kalibrační křivka (Graf 10 a Graf 11).

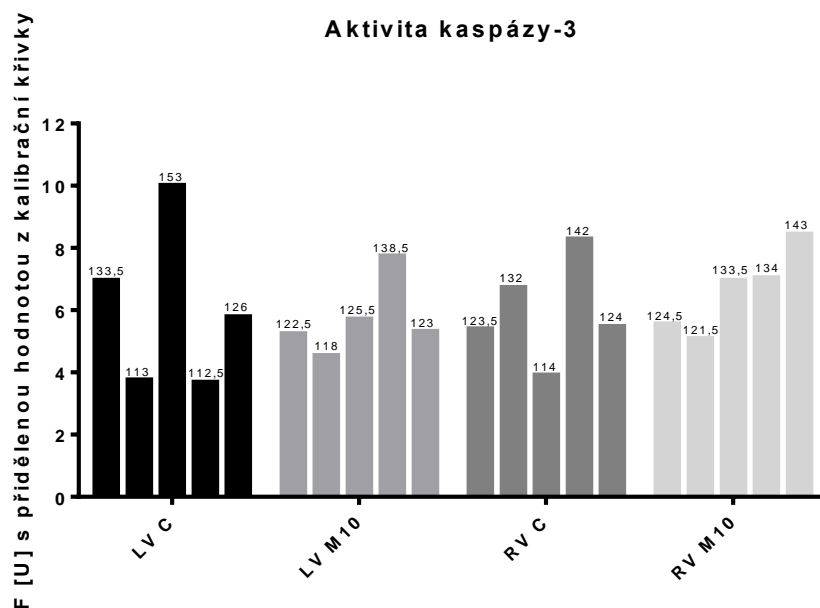
Každé naměřené hodnotě fluorescence byla přiřazena odpovídající hodnota od 0 do 10 na ose x. Graf 12 a Graf 13 znázorňují hodnoty fluorescence vztažené k námi zvolenému rozmezí 0-10. Hodnoty získané z kalibrační křivky jsme vydělili změřenou koncentrací proteinů v odpovídajících vzorcích. Z výsledných hodnot, které jsme získali v obou dnech, byly po zprůměrování sestrojeny grafy pro jednotlivé skupiny (Graf 14 a Graf 15).



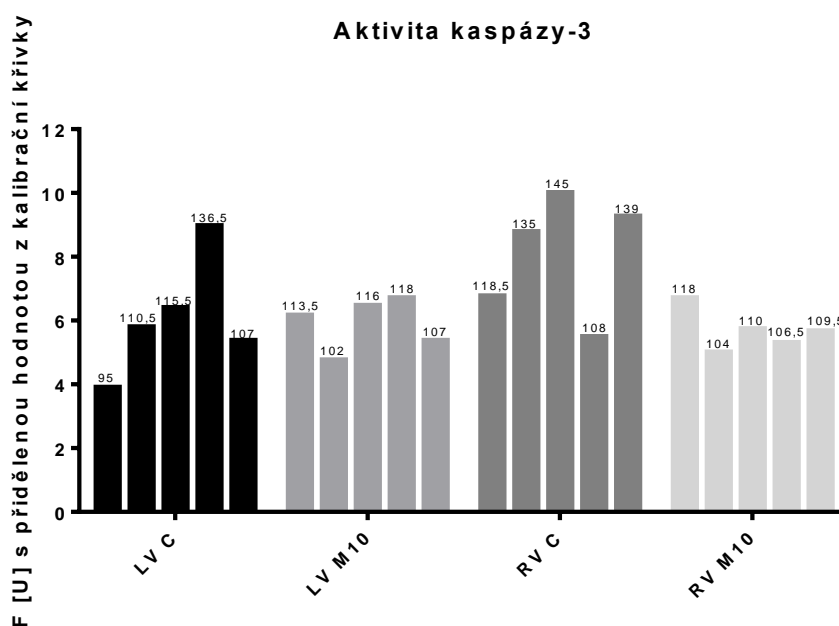
Graf 10: Simulovaná kalibrační křivka sestavená pro hodnoty fluorescence první den měření aktivity kaspázy-3. Fluorescence na ose y je udaná v jednotkách (Units=U). Osa x – hodnoty v rozmezí 0-10.



Graf 11: Simulovaná kalibrační křivka sestavená pro hodnoty fluorescence druhý den měření aktivity kaspázy-3. Fluorescence na ose y je udaná v jednotkách (Units=U). Osa x – hodnoty v rozmezí 0-10.

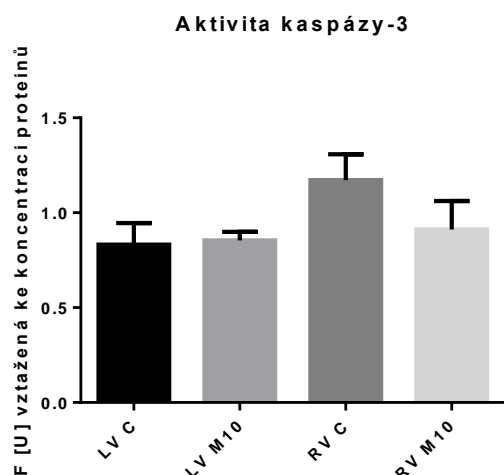


Graf 12: Hodnoty fluorescence změřené první den měření aktivity kaspázy-3.

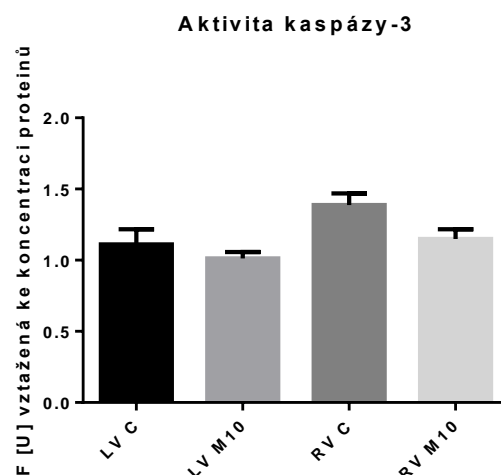


Graf 13: Hodnoty fluorescence změřené druhý den měření aktivity kaspázy-3.

Graf 12 a 13: Grafické znázornění aktivity kaspázy-3. Hodnoty naměřené fluorescence jsou uvedeny nad každým sloupcem. Tyto hodnoty jsou udány v jednotkách (Units=U). Fluorescence byla změřena za excitace při vlnové délce 485 nm a emise při vlnové délce 520 nm v každém ze vzorků. LV C, RV C – kontrolní vzorky levých a pravých komor; LV M10, RV M10 – morfinem ovlivněné vzorky levých a pravých komor; osa x – naměřená fluorescence v jednotlivých vzorcích; osa y – fluorescence vztažená k hodnotě získané z kalibrační křivky



Graf 14: Aktivita kaspázy-3 po zprůměrování hodnot, které jsme obdrželi z kalibrační křivky, a po vztažení ke koncentraci proteinů první den měření.



Graf 15: Aktivita kaspázy-3 po zprůměrování hodnot, které jsme obdrželi z kalibrační křivky, a po vztažení ke koncentraci proteinů druhý den měření.

Graf 14 a Graf 15: Grafické znázornění aktivity kaspázy-3 po zprůměrování hodnot v jednotlivých skupinách a po vztažení ke koncentraci proteinů. Mezi kontrolními skupinami a morfinem ovlivněnými skupinami docházelo ke snížení aktivity kaspázy-3. Toto snížení však nebylo signifikantní, jelikož v rámci skupin byly naměřeny velké odchylky od průměrů. LV C, RV C – vzorky levých a pravých komor z kontrolních potkanů; LV M10, RV M10 – vzorky levých a pravých komor z morfinem ovlivněných potkanů; U – jednotky fluorescence (Units); osa x – aktivita kaspázy-3 v jednotlivých skupinách; osa y – hodnoty fluorescence vztažené ke koncentraci proteinů

10. Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo studium exprese vybraných apoptotických proteinů ve vzorcích LV po podání malých dávek (0,1 mg/kg/den; 1 mg/kg/den) morfinu po dobu 28 dní a velkých dávek (10 mg/kg/den) morfinu po dobu 10 dní a také po podání dávky 1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní s následným vysazením (abstinencí) v podání po dobu 1 týden. Práce se zabývala sledováním proapoptotických proteinů AIF, Bax, Bak a BH3-only proteinu Bid. Studovaným antiapoptotickým proteinem byl protein Bcl-2. Klíčovou buněčnou proteázou je kaspáza-3. Proto byla naše pozornost zaměřena nejen na studium exprese tohoto enzymu, ale také jsme ve vzorcích pravých a levých komor potkana po ovlivnění vysokou (10 mg/kg/den po dobu 10 dní) dávkou morfinu změřili aktivitu kaspázy-3, která byla porovnána s aktivitou u kontrolních jedinců. Práce se rovněž zabývala expresí Akt 1/2/3 a GSK-3 β . Exprese všech proteinů byla zjišťována ve frakci PNS (postnukleární supernatant), která obsahuje cytosol a zhomogenizované organely ve volné suspenzi. Některé z apoptotických proteinů (Bcl-2, Bax, kaspáza-3 a její aktivní podjednotka, Bid, Bak) byly ve vzorcích myokardu detekovány po změně podmínek (důkladné promytí dH₂O a inkubace v TBS pufru bez mléka). Cílem této práce bylo tedy zjistit, zda některá z analyzovaných dávek morfinu působí protektivně či vyvolává apoptózu v myokardu potkana.

Je známo, že opioidy působí kardioprotektivně proti ischemickému-reperfučnímu poškození nejen prostřednictvím aktivace δ -OR, ale také κ -OR (Schultz et al., 1997; Chen et al., 2008b). Morfin je silné analgetikum, které se používá například ke zmírnění bolesti při akutním infarktu myokardu (Shi et al., 2003; Kim et al., 2010). Zatím však nebylo provedeno mnoho experimentů zabývajících se studiem apoptotického procesu v myokardu v souvislosti s užíváním opioidů. V tomto kontextu byla apoptóza převážně studována v mozkové tkáni (Chen et al., 2008a; Mao et al., 2002) nebo na buněčných liniích (Tenconi et al., 1996; Zhaleh et al., 2012). Obecně je uznáváno, že podávání nízkých dávek opioidů podporuje růst buněk a proliferaci, a naopak vysoké dávky opioidů vedou k apoptóze. Zatím je však nejasné, v jakých dávkách mají opioidy protektivní účinky a za jakých dávek směřují buňku do apoptózy. Má se za to, že dlouhodobé chronické podávání spíše vede k expresi proapoptotických proteinů a řídí buňku do programované buněčné smrti. Na druhou stranu, krátkodobé podávání opioidů vykazuje protektivní účinky.

Z našich výsledků vyplývá, že podání dávky 0,1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní může mít spíše protektivní antiapoptotické účinky v myokardu potkana, neboť při této dávce docházelo k signifikantnímu zvýšení v expresi proteinu Bcl-2 v LV potkana. Toto zjištění poukazuje na regulaci vnitřní (mitochondriální) dráhy apoptózy. Současně při podávání této

dávky byla patrná tendence ke snížení exprese proteinu Bax, toto snížení ovšem nebylo signifikantní. Při podávání dávky 1 mg/kg/den po dobu 28 dní jsme nepozorovali žádné významnější změny v expresi studovaných proteinů. Bylo pozorováno pouze mírné zvýšení exprese antiapoptotické serin-treoninové protein kinázy Akt 1/2/3 a snížení exprese proapoptotického proteinu Bax, které však nebylo signifikantní. Je možné, že tato dávka může také vykazovat určité protektivní účinky, které se však neprojevují na úrovni exprese sledovaných apoptotických proteinů. Mohlo to být způsobeno použitím málo citlivé metody imunoblotu, či nedostatečně specifickou komerční protilátkou, která byla ředěna v TBS pufru bez mléka. Vliv morfinu na apoptózu je poněkud kontroverzní. Některé studie uvádějí, že morfin působí toxicky na neurony a vyvolává programovanou buněčnou smrt, v jiných experimentech jsou morfinu připisovány prospěšné účinky ochraňující před apoptózou (Zhaleh et al., 2012). Buněčná linie PC12 je odvozená z nádorových buněk pocházejících z dřene nadledvin potkana. Na této buněčné linii bylo zjištěno, že morfin a další agonisté OR po podání nízkých dávek podporují neuritogenezi, zatímco vysoké dávky těchto opioidů vykazují inhibiční účinky na utváření neuritů (Tenconi et al., 1996). Suzuki s kolegy také prokázal protektivní účinky nízkých koncentrací morfinu na buněčné kultuře lymfocytů. Apoptóza byla inhibována právě nízkými koncentracemi morfinu (Suzuki et al., 2003). V jiných experimentálních studiích, které byly uskutečněny na buněčných kulturách, docházelo k inhibici apoptózy po podání jak nízké, tak vysoké dávky morfinu (Zhaleh et al., 2012). Bylo zjištěno, že krátkodobé podání nízké dávky morfinu inhibovalo programovanou buněčnou smrt signální drahou vedoucí přes PI3K/Akt (Zhaleh et al., 2012).

Další skupinou potkanů, u které byla sledována exprese apoptotických proteinů, byla skupina ovlivněná 1 mg/kg/den morfinu podávaného po 28 dní s následnou abstinencí, která trvala 7 dní. U této skupiny jsme pozorovali signifikantní zvýšení exprese kaspázy-3 a také její aktivní podjednotky p11. Také byla signifikantně zvýšena exprese GSK-3 β po dlouhodobém podání 1 mg/kg/den morfinu s následnou týdenní abstinencí. Antiapoptotické proteiny (Bcl-2 a Akt 1/2/3) nevykazovaly v tomto případě žádné významnější změny v expresi. Tento výsledek poukazuje na fakt, že u této skupiny ovlivněné morfinem s následným vysazením po dobu 1 týdne, docházelo k apoptotickému procesu, což je zřetelné ze signifikantně zvýšené exprese kaspázy-3 a také GSK-3 β . Kaspázy patří k významným regulačním proteázám v buňce. Jedna z nejdůležitějších kaspáz je již zmiňovaná kaspáza-3. Aktivní enzym je složen ze dvou malých podjednotek p11 a ze dvou velkých podjednotek p17. Mao se svými kolegy popsal, že po dlouhodobém podávání morfinu dochází ke zvýšení exprese kaspázy-3 a proapoptotického proteinu Bax a ke snížení exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 v zadním rohu míšním (Mao et al., 2002). V našem

případě nedocházelo k signifikantnímu snížení Bcl-2 proteinu ani ke zvýšení exprese proteinu Bax. Nedávno však byla publikovaná experimentální studie, ve které dlouhodobé podávání morfinu vedlo k opačným účinkům, tedy ke snížení exprese proteinu Bax, což naznačovalo protektivní roli dlouhodobého podávání morfinu v programované buněčné smrti (Chen et al., 2008a). U myši bylo zkoumáno dlouhodobé podávání morfinu a následná abstinence. V tomto případě docházelo k aktivaci vnější i vnitřní signální dráhy. Zvýšená exprese proapoptotických proteinů byla doprovázena zvýšenou úrovní aktivní kaspázy-3, která je hlavním efektorovým enzymem obou signálních drah (Emeterio et al., 2006). Chronické užívání morfinu vedlo v mozkové tkáni k zvýšení exprese proapoptotického proteinu Fas a tím pádem docházelo k aktivaci apoptózy vnější signalizační dráhou. Společně s tím byla snížena exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Boronat et al., 2001). V souvislosti s apoptózou byl studován také metadon, který je používán k léčení ze závislosti na heroinu. Myši dlouhodobě ovlivňované metadonem a následně vystavené opakované abstinenci vykazovaly změny v expresi proapoptotických proteinů (Tramullas et al., 2007). GSK-3 byla původně popsána v souvislosti se syntézou glykogenu. Nyní je ale zřejmé, že se tato protein kináza podílí na regulaci mnoha buněčných funkcí. Izoforma GSK-3 β je ve velké míře studována v kontextu srdečního poškození. Může být inaktivována různými mechanismy, například fosforylací pomocí Akt 1/2/3 (Miyamoto et al., 2009). Tato serin-treoninová protein kináza má nezastupitelnou roli v regulaci programované buněčné smrti a buněčné proliferace. Fosforylace prostřednictvím Akt 1/2/3 nastává na Ser-9 a je velmi důležitá pro buněčné přežívání. Akt 1/2/3 je zapojena v antiapoptotickém působení skrze aktivaci PI3K. Akt tak může modulovat také změny v expresi Bcl-2 a Bax proteinů (Matsuzaki et al., 1999). Ukázalo se, že morfin ochraňuje srdce před ischemickým-reperfučním poškozením prostřednictvím inhibice GSK-3 β (Obame et al., 2008). Pokud je GSK-3 β inhibována prostřednictvím signalizační kaskády PI3K/Akt, nedochází k permeabilizaci mitochondriální membrány a k otevření MPTP póru. Tímto způsobem morfin vykazuje antiapoptotické účinky. V našem případě nedocházelo k signifikantnímu ovlivnění exprese Akt 1/2/3 po dlouhodobém podání nízké dávky morfinu následované týdenní abstinencí. Tímto může být vysvětlena zvýšená exprese GSK-3 β ve vzorcích levých komor, které byly pro pokus použity.

Bylo zjištěno, že AIF (faktor indukující apoptózu) může být uvolněn z mitochondrií mechanismem, který je závislý na aktivaci kaspáz, ale také mechanismem, který na aktivaci kaspáz nezávisí (Candé et al., 2004). V našem experimentu jsme pozorovali významné snížení exprese proteinu AIF po podání vysoké dávky morfinu (10 mg/kg/den) po dobu 10 dní. Tento pokles byl vyhodnocen jako signifikantní. Z tohoto výsledku můžeme usuzovat na protektivní účinky vysoké dávky morfinu. Při podání této dávky docházelo také k mírnému zvýšení

exprese Akt 1/2/3, což by mohlo souviset se sníženou expresí AIF a mohlo tak naznačovat lepší buněčné přežívání. Z hlediska statistiky bylo však toto zvýšení zamítnuto těsně nad hladinou významnosti $p < 0,05$. AIF byl původně popsán jako protein, který se volně nachází v intermembránovém prostoru (Susin et al., 1999b). V práci vedené Arnoultem bylo navrženo, že AIF není solubilní, ale že je zakotven do vnitřní mitochondriální membrány, neboť po permeabilizaci membrány nedocházelo k jeho uvolnění z mitochondrií (Arnoult et al., 2002). Výsledek našeho experimentu ukazuje, že po podání morfinu v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dní může být inhibovaná vnitřní (mitochondriální) dráha, neboť docházelo k signifikantnímu snížení exprese AIF.

Stanovení aktivity kaspázy-3 v pravých a levých komorách myokardu potkana po podání vysoké dávky morfinu (10 mg/kg/den po dobu 10 dní) bylo dalším cílem této diplomové práce. Aktivita kaspázy-3 byla stanovena za použití fluorescenčně značeného substrátu N-Ac-DEVD-N'-MC-R110. Detekce aktivních kaspáz může sloužit jako marker programované buněčné smrti. Pro tento experiment byly připraveny čerstvé vzorky, protože enzymy jsou náchylné proteiny. Může snadno dojít ke změnám v aktivitě enzymů a ty se stávají citlivějšími k proteolytické degradaci. Po doručení fluorescenčního substrátu bez standardu jsme se rozhodli vztáhnout naměřené hodnoty fluorescence ke koncentracím proteinů, které byly ve vzorcích stanoveny BCA metodou. Z našich výsledků, které byly získány odděleně ve dvou dnech, lze usuzovat, že po podání vysoké dávky morfinu docházelo k poklesu aktivity kaspázy-3 jak ve vzorcích připravených z pravých, tak i levých komor. Snížení aktivity kaspázy-3 ve vzorcích připravených ze zvířat ovlivněných vysokou dávkou morfinu však na hladině $p < 0,05$ nebylo prokázáno jako signifikantní. Statistická významnost byla v tomto případě zamítnuta těsně nad hladinou $p < 0,05$. Toto pozorování může naznačovat, že podání vysoké dávky 10 mg/kg/den po dobu 10 dní může vykazovat jisté protektivní účinky a neznámým mechanismem snižovat množství aktivní efektorové kaspázy-3. Již v předchozím experimentu při podání této dávky jsme pozorovali snížení exprese proteinu AIF. Výše bylo zmíněno, že AIF může být z mitochondrií uvolněn způsobem, který není závislý na aktivaci kaspáz. Druhý způsob uvolnění AIF je závislý na aktivitě kaspáz. Snížení exprese AIF by tedy mohlo být vysvětleno právě druhým mechanismem. Můžeme se domnívat, že enzymy účastníci se apoptózy byly převážně v inaktivní formě a tím pádem nedocházelo ke štěpení proteinů z Bcl-2 rodiny (např. Bid). Nezkrácený Bid poté netranslokoval do mitochondrií a cytochrom c nebyl uvolněn do cytosolu. S největší pravděpodobností nedocházelo k tvorbě apoptozómu a k aktivaci efektorových kaspáz (např. kaspáza-3). Aktivita kaspázy-3 je v mnoha studiích měřena na buněčných kulturách za pomoci substrátů založených na kumarínových barvivech (Jonges

et al., 2001; O'Donovan et al., 2003). Určení, zda při dlouhodobém užívání morfinu dochází k apoptóze, je zásadní pro terapeutické užívání opioidů při léčbě bolesti. V jedné studii byl jedné skupině myší podáván morfin spolu s lipopolysacharidem, druhá skupina dostávala pouze samotný morfin. Aktivita kaspáz byla detekována pomocí polyspecifické kaspázové próby. Morfin sám nezpůsobil apoptózu, ale podání morfinu společně s lipopolysacharidem zvyšovalo aktivitu kaspáz v játrech, brzlíku a slezině (Olin et al., 2010). Bylo zjištěno, že morfin může způsobovat apoptózu lymfocytů jak po podání malých, tak vyšších dávek. Použitím chromogenního substrátu byla změřena aktivita kaspázy-3 a kaspázy-8. Apoptóza byla v tomto případě zprostředkována dvěma různými mechanismy. V prvním případě po podání malých či vyšších dávek morfinu docházelo na lymfocytech k aktivaci μ -OR, která vedla k aktivaci kaspázy-8 a kaspázy-3. V druhém případě při podání vyšších dávek docházelo k aktivaci μ -OR na makrofázích a adherentních buňkách. Tato aktivace vyvolala u makrofágů produkci NO, který dále indukoval apoptózu (Wang et al., 2001).

Studii zabývajících se sledováním exprese apoptotických proteinů v srdci při užívání morfinu není mnoho. Naše výsledky naznačují, že morfin může ovlivňovat apoptotický proces v myokardu potkana a jeho vliv je závislý na dávce.

11. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo sledování exprese vybraných apoptotických proteinů, které se účastní vnitřní a vnější signální dráhy v myokardu potkana po podání různých dávek morfinu a na základě toho usoudit, zda morfin vykazuje v některé z dávek protektivní účinky. Je známo, že podání opioidů v nízkých dávkách podporuje buněčné přežívání, zatímco při chronickém podávání velkých dávek opioidů může nastat programovaná buněčná smrt. U zvířat, která dostávala 0,1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní, byla signifikantně zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2. Exprese ostatních apoptotických proteinů se více méně nelišila od exprese u kontrolních zvířat. Můžeme tedy usuzovat na protektivní účinky této nízké dávky morfinu v myokardu potkana. Při podávání dávky 1 mg/kg/den morfinu po dobu 28 dní nebyla pozorována žádná významná změna v expresi námi analyzovaných apoptotických proteinů. I přes to mělo podání této nízké dávky morfinu spíše tendenci ochraňovat myokard před apoptotickou buněčnou smrtí, neboť docházelo k mírnému snížení exprese kaspázy-3 a proapoptotického proteinu Bax a současně bylo pozorováno také mírné zvýšení v expresi serin-treoninové protein kinázy Akt. Totožná dávka morfinu, po které následovala sedmidenní abstinence, vykazovala naopak proapoptotické účinky. Bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese kaspázy-3 i její aktivní podjednotky p11 a GSK-3 β . Tento výsledek naznačuje, že dlouhodobé podávání morfinu a následná abstinence vyvolává v myokardu změny v expresi proteinů a vede k apoptóze. Působení morfinu v dávce 10 mg/kg/den po dobu 10 dní snižovalo expresi proteinu AIF. Lze tedy předpokládat, že podání morfinu v této dávce zprostředkovává kardioprotektivní účinky. Výzkum apoptotického procesu v srdeční tkáni si zasluhuje více pozornosti, protože stále není mnoho studií, které by se zabývaly změnami exprese apoptotických proteinů v myokardu po dlouhodobém užívání opioidů.

12. Literatura a informační zdroje

- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., & Yuan, J.Y. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2), 171-171.
- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J., & Ameisen, J.C. (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *Journal of Cell Biology* 159(6), 923-929.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., & Molkenin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology* 9(5), 550-U122.
- Baines, C.P., & Molkenin, J.D. (2005). Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38(1), 47-62.
- Baines, C.P., Song, C.X., Zheng, Y.T., Wang, G.W., Zhang, J., Wang, O.L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E.M., & Ping, P.P. (2003). Protein kinase C epsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circulation Research* 92(8), 873-880.
- Baines, C.P., Zhang, J., Wang, G.W., Zheng, Y.T., Xiu, J.X., Cardwell, E.M., Bolli, R., & Ping, P. (2002). Mitochondrial PKC epsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart - Enhanced mitochondrial PKC epsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKC epsilon-induced cardioprotection. *Circulation Research* 90(4), 390-397.
- Ballantyne, J.C. (2008). Medical use of opioids: what drives the debate? A brief commentary. *European Journal of Pain*, 67-68.
- Banerjee, J., & Ghosh, S. (2004). Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323(1), 310-314.
- Barrere-Lemaire, S., Combes, N., Sportouch-Dukhan, C., Richard, S., Nargeot, J., & Piot, C. (2005). Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an Ins(1,4,5)P-3 signaling pathway in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 288(1), H83-H88.
- Boettcher, C., Fellermeier, M., Drager, B., & Zenk, M.H. (2005). How human neuroblastoma cells make morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(24), 8495-8500.
- Boronat, M.A., Garcia-Fuster, M.J., & Garcia-Sevilla, J.A. (2001). Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *British Journal of Pharmacology* 134(6), 1263-1270.
- Brownstein, M.J. (1993). A brief-history of opiates, opioid-peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(12), 5391-5393.

- Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., & Kroemer, G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death and Differentiation* 11(6), 591-595.
- Chanoit, G., Lee, S., Xi, J., Zhu, M., McIntosh, R.A., Mueller, R.A., Norfleet, E.A., & Xu, Z.L. (2008). Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295(3), H1227-H1233.
- Chen, Q.Y., Cui, J., Zhang, Y., & Yu, L.C. (2008a). Prolonged morphine application modulates Bax and Hsp70 levels in primary rat neurons. *Neuroscience Letters* 441(3), 311-314.
- Chen, Z.L., Li, T.Z., & Zhang, B.X. (2008b). Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Journal of Surgical Research* 145(2), 287-294.
- Cheng, E.H.Y., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., & Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278(5345), 1966-1968.
- Clem, R.J., Cheng, E.H.Y., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., & Hardwick, J.M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-x(L) through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2), 554-559.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 341, 233-249.
- Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J., & Kitsis, R.N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation Research* 95(10), 957-970.
- Danial, N.N. (2007). BCL-2 family proteins: Critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research* 13(24), 7254-7263.
- Darmon, A.J., Nicholson, D.W., & Bleackley, R.C. (1995). Activation of the apoptotic protease cyp32 by cytotoxic t-cell-derived granzyme-b. *Nature* 377(6548), 446-448.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H.A., Gotoh, Y., & Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2), 231-241.
- Davis, M.P., Glare, P.A., & Hardy, J. (2009). Morphine. Opioids in Cancer Pain. 127-155.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J.Y. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22(53), 8543-8567.
- delPeso, L., GonzalezGarcia, M., Page, C., Herrera, R., & Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278(5338), 687-689.
- Deng, Y.B., Ren, X.Y., Yang, L., Lin, Y.H., & Wu, X.W. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNF alpha-induced apoptosis. *Cell* 115(1), 61-70.

- Donovan, N., Becker, E.B.E., Konishi, Y., & Bonni, A. (2002). JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *Journal of Biological Chemistry* 277(43), 40944-40949.
- Duarte, D., F. (2005). Opium and opioids: a brief history. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 55, 135-146.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., & Johnson, P.J. (2004). Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304(5668), 253-257.
- Emeterio, E.P.S., Tramullas, M., & Hurle, M.A. (2006). Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research* 83(7), 1352-1361.
- Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., & Ovize, M. (2008). Inhibition of GSK3 beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117(21), 2761-2768.
- Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., & Bleackley, R.C. (2003). Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 18(3), 355-365.
- Gustafsson, A.B., & Gottlieb, R.A. (2008). Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovascular Research* 77(2), 334-343.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., & Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research* 61(3), 372-385.
- Haunstetter, A., & Izumo, S. (1998). Apoptosis - Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation Research* 82(11), 1111-1129.
- He, Z., Peng, Z., Jin, L., & Chai, X. (2010). Effect of morphine preconditioning on mitochondrial permeability transition pore after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Central South University (Medical Science)* 35(8), 800-806.
- Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Lai, N.C., Niesman, I.R., Farquhar, M.G., & Insel, P.A. (2005). G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280(35), 31036-31044.
- Igney, F.H., & Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2(4), 277-288.
- Jang, Y.G., Xi, J.K., Wang, H.H., Mueller, R.A., Norfleet, E.A., & Xu, Z.L. (2008). Postconditioning prevents Reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology* 108(2), 243-250.
- Jang, Y.H., Wang, H.H., Xi, J.K., Mueller, R.A., Norfleet, E.A., & Xu, Z.L. (2007). NO mobilizes intracellular Zn²⁺ via cGMP/PKG signaling pathway and prevents mitochondrial oxidant damage in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 75(2), 426-433.

- Javadov, S., & Karmazyn, M. (2007). Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cellular Physiology and Biochemistry* 20(1-4), 1-22.
- Jonges, L.E., Nagelkerke, J.F., Ensink, N.G., van der Velde, E.A., Tollenaar, R., Fleuren, G.J., van de Velde, C.J.H., Morreau, H., & Kuppen, P.J.K. (2001). Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Laboratory Investigation* 81(5), 681-688.
- Kang, P.M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A., & Izumo, S. (2000). Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circulation Research* 87(2), 118-125.
- Kang, P.M., & Izumo, S. (2003). Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends in Molecular Medicine* 9(4), 177-182.
- Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W., & Thompson, C.B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-x(L). *Molecular and Cellular Biology* 17(12), 7040-7046.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4), 239-&.
- Kim, J.H., Song, S.K., Kim, J.S., Park, Y.H., Kim, J., Chun, K.J., & Jang, Y.H. (2010). Morphine-Induced Postconditioning Modulates Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Via Delta-1 Opioid Receptors Activation in Isolated Rat Hearts. *Circulation* 122(21).
- Kluck, R.M., BossyWetzel, E., Green, D.R., & Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303), 1132-1136.
- Kohler, C., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods* 265(1-2), 97-110.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., & Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427(6973), 461-465.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weller, S., Oh, K.J., & Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation* 7(12), 1166-1173.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., & Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular-distribution of the bcl-2 oncoprotein - residence in the nuclear-envelope, endoplasmic-reticulum, and outer mitochondrial-membranes. *Cancer Research* 53(19), 4701-4714.
- Kumar, S. (2004). Measurement of caspase activity in cell undergoing apoptosis. *Methods in Molecular Biology* 282, 19-30.

- Kuwana, T., & Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15(6), 691-699.
- Leist, M., & Jaattela, M. (2001). Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death and Differentiation* 8(4), 324-326.
- Li, H.L., Zhu, H., Xu, C.J., & Yuan, J.Y. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., & Wang, X.D. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4), 479-489.
- Li, R., Wong, G.T.C., Wong, T.M., Zhang, Y., Xia, Z.Y., & Irwin, M.G. (2009). Intrathecal Morphine Preconditioning Induces Cardioprotection via Activation of Delta, Kappa, and Mu Opioid Receptors in Rats. *Anesthesia and Analgesia* 108(1), 23-29.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X.D. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4), 481-490.
- Majumder, P.K., Pandey, P., Sun, X.G., Cheng, K.D., Datta, R., Saxena, S., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome C release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275(29), 21793-21796.
- Mao, J.R., Sung, B.K., Ji, R.R., & Lim, G. (2002). Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *Journal of Neuroscience* 22(17), 7650-7661.
- Martin, S.J., Finucane, D.M., AmaranteMendes, G.P., O'Brien, G.A., & Green, D.R. (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *Journal of Biological Chemistry* 271(46), 28753-28756.
- Matsuzaki, H., Tamatani, H., Mitsuda, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Miyake, S., & Tohyama, M. (1999). Activation of Akt Kinase Inhibits Apoptosis and Changes in Bcl-2 and Bax Expression Induced by Nitric Oxide in Primary Hippocampal Neurons. *Journal of Neurochemistry* 73(5), 2037-2046.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More than just a powerhouse. *Current Biology* 16(14), R551-R560.
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., & Brown, J.H. (2009). Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41(2), 169-180.
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological Reviews* 88(2), 581-609.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6(11), 1028-1042.

- O'Donovan, N., Crown, J., Stunell, H., Hill, A.D.K., McDermott, E., O'Higgins, N., & Duffy, M.J. (2003). Caspase 3 in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 9(2), 738-742.
- Obame, F.N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Rande, J.L., Berdeaux, A., & Morin, D. (2008). Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326(1), 252-258.
- Olin, M.R., Roy, S., & Molitor, T. (2010). In Vivo Morphine Treatment Synergistically Increases LPS-Induced Caspase Activity in Immune Organs. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 5(4), 546-552.
- Ow, Y.L.P., Green, D.R., Hao, Z., & Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(7), 532-542.
- Patel, H.H., Tsutsumi, Y.M., & Roth, D.M. (2008). Mito-controversies: Mitochondrial permeability transition pore and myocardial reperfusion injury. *Anesthesiology* 108(2), 182-184.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., & Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1644(2-3), 83-94.
- Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M., Drager, B., & Zenk, M.H. (2004). Endogenous formation of morphine in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39), 14091-14096.
- Pugsley, M.K. (2002). The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 93(1), 51-75.
- Quan, L.T., Tewari, M., Orourke, K., Dixit, V., Snipas, S.J., Poirier, G.G., Ray, C., Pickup, D.J., & Salvesen, G.S. (1996). Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(5), 1972-1976.
- Rano, T.A., Timkey, T., Peterson, E.P., Rotonda, J., Nicholson, D.W., Becker, J.W., Chapman, K.T., & Thornberry, N.A. (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: Application to interleukin-1 beta converting enzyme (ICE). *Chemistry & Biology* 4(2), 149-155.
- Rastogi, R.P., Richa, & Sinha, R.P. (2009). Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *Excli Journal* 8, 155-181.
- Renshaw, S.A., Dempsey, C.E., Barnes, F.A., Bagstaff, S.M., Dower, S.K., Bingle, C.D., & Whyte, M.K.B. (2004). Three novel bid proteins generated by alternative splicing of the human bid gene. *Journal of Biological Chemistry* 279(4), 2846-2855.
- Rouaux, C., Jokic, N., Mbebi, C., Boutillier, S., Loeffler, J.P., & Boutillier, A.L. (2003). Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *Embo Journal* 22(24), 6537-6549.

- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., & Fesik, S.W. (1997). Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex: Recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275(5302), 983-986.
- Schiff, P.L. (2002). Opium and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education* 66(2), 186-194.
- Schultz, J.J., Hsu, A.K., & Gross, G.J. (1997). Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta) opioid receptor in the intact rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29(8), 2187-2195.
- Shi, E.Y., Jiang, X.J., Bai, H., Gu, T.X., Chang, Y.T., & Wang, J.K. (2003). Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion. *Chinese Medical Journal* 116(7), 1059-1062.
- Shi, Y.G. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9(3), 459-470.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal* 328, 721-732.
- Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., & Tsujimoto, Y. (2002). Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by apro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene* 21(32), 4944-4956.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., & Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *Journal of Experimental Medicine* 189(2), 381-393.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., & Kroemer, G. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718), 441-446.
- Suzuki, S., Chuang, L.F., Doi, R.H., & Chuang, R.Y. (2003). Morphine suppresses lymphocyte apoptosis by blocking p53-mediated death signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308(4), 802-808.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., & Wong, W.W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *Journal of Biological Chemistry* 272(15), 9677-9682.
- Tanaka, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Nishikawa, T., Kasajima, T., Marumo, F., & Hiroe, M. (1994). Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of fas antigen messenger-rna in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation Research* 75(3), 426-433.
- Tegeder, I., & Geisslinger, G. (2004). Opioids as modulators of cell death and survival - Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological Reviews* 56(3), 351-369.

- Tenconi, B., Lesma, E., DiGiulio, A.M., & Gorio, A. (1996). High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neuritogenesis in PC12 cells. *Developmental Brain Research* 94(2), 175-181.
- Thornberry, N.A., Ranon, T.A., Pieterse, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., GarciaCalvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., & Nicholson, D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B - Functional, relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272(29), 17907-17911.
- Tramullas, M., Martinez-Cue, C., & Hurle, M.A. (2007). Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology* 193(1), 107-120.
- von Harsdorf, R., Li, P.F., & Dietz, R. (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99(22), 2934-2941.
- Wang, J.H., Charboneau, R., Balasubramanian, S., Barke, R.A., Loh, H.H., & Roy, S. (2001). Morphine modulates lymph node-derived T lymphocyte function: role of caspase-3,-8, and nitric oxide. *Journal of Leukocyte Biology* 70(4), 527-536.
- Wang, K.K.W., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R.V., Glantz, S.B., & Morrow, J.S. (1998). Simultaneous degradation of alpha II- and beta II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 273(35), 22490-22497.
- Wang, Z.Q., Liao, J.F., & Diwu, Z.J. (2005). N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110: novel caspase-3 fluorogenic substrates for cell-based apoptosis assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15(9), 2335-2338.
- Wittert, G., Hope, P., & Pyle, D. (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218(3), 877-881.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., & Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 139(5), 1281-1292.
- Woodfield, K., Ruck, A., Brdiczka, D., & Halestrap, A.P. (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochemical Journal* 336, 287-290.
- Xi, J.K., Tian, W., Zhang, L., Jin, Y.L., & Xu, Z.L. (2010). Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn²⁺/GSK-3 beta signal pathway in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298(2), H601-H607.
- Xiang, J., Chao, D.T., & Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(25), 14559-14563.

Yamamoto, K., Ichijo, H., & Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and Cellular Biology* 19(12), 8469-8478.

Zhaleh, H., Azadbakht, M., Pour, A., B., & Zhaleh, M. (2012). Morphine Inhibits Cell Death in PC12 Cells by Activation of PI3K/Akt Signal Pathway. *European Journal of Biological Sciences* 5(1), 6-10.

Zhang, S.Z., Wang, N.F., Xu, J., Gao, Q., Lin, G.H., Bruce, I.C., & Xia, Q. (2006). kappa-Opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology* 105(3), 550-556.

Zhang, Y., Irwin, M.G., & Wong, T.M. (2004). Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology* 101(4), 918-923.

Zhou, H.Z., Karliner, J.S., & Gray, M.O. (2002). Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC-epsilon and Akt. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283(1), H165-H174.

[1] http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch19_wAccess.pdf
(6.4.2013)